

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Klinická a toxikologická analýza



Bc. Zuzana Srchová

Analýza bílkoviny MRCK alfa pomocí HPLC

Analysis of MRCK alpha protein by HPLC

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.5. 2013

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat především svému vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za jeho odbornou pomoc a vedení, ochotu, trpělivost a cenné rady, kterými přispěl k vypracování této práce. Dále děkuji Mgr. Pavlíně Ptáčkové za spolupráci a věnovaný čas. Rovněž velké poděkování patří doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc., RNDr. Janu Srbkovi Ph.D. a Mgr. Petru Kozlíkovi za pomoc při řešení problematiky této práce.

Práce na tomto projektu byla finančně podporována výzkumným záměrem MSM0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Abstrakt

Hlavní náplní této diplomové práce bylo analyzovat a posléze získat protein MRCK alfa z biologických vzorků. Pro lepší vizualizaci je příslušná proteinová kináza zfúzována se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP), který fluoreskuje zeleně po ozáření ultrafialovým světlem. Jednotlivá měření se realizovala pomocí zařízení HPLC s UV a fluorescenční detekcí. Nutnou součástí bylo provedení řady úkonů zabývajících se charakterizací dostupných biologických vzorků, které se svým obsahem od sebe odlišují. Snahou bylo vyzkoušet širokou škálu různých kolon, pracujících na principu reverzní chromatografie, přes iontově výměnnou až po gelově permeační chromatografii. Dále bylo potřeba nalézt vhodnou mobilní fázi a také optimalizovat podmínky měření pro tuto separaci proteinů. Velkým pomocníkem při identifikaci látek přítomných ve vzorcích se stala i hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova

Bílkovina MRCK alfa, zelený fluorescenční protein, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Abstract

The aim of this diploma thesis was to analyze and then obtain MRCK alpha protein from biological samples. For the better visualization is protein kinase fused with green fluorescent protein (GFP), which fluoresces green light, when irradiated with ultraviolet light. Individual measurements were implemented by using the HPLC apparatus with UV and fluorescence detection. A necessary part of the implementation of a series of acts dealing with the characterization of available biological samples, which differ in their content from each other. The aim was to test a wide range of different columns, working on the principle of reverse-phase chromatography, ion exchange chromatography and gel permeation chromatography. Furthermore, it was necessary to find a suitable mobile phase and optimize the measuring conditions for the separation of proteins. Helpful in the identification of compounds present in the samples became mass spectrometry.

Keywords

MRCK alpha protein, green fluorescent protein, high performance liquid chromatography

Obsah

1	ÚVOD	- 11 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 13 -
2.1	HPLC	- 13 -
2.1.1	Trendy v oblasti HPLC	- 13 -
2.1.2	Spojení s hmotnostní spektrometrií	- 15 -
2.2	Proteomika	- 15 -
2.3	Metody stanovení bílkovin	- 17 -
2.3.1	Chromatografické metody	- 17 -
2.3.2	Elektroforetické metody	- 19 -
2.4	Detekce bílkovin	- 20 -
2.5	Příprava buněčného lyzátu obsahujícího GFP-MRCK alfa	- 21 -
2.5.1	Buněčná linie HeLa	- 21 -
2.5.2	GFP	- 22 -
2.5.3	Chemické vlastnosti GFP	- 24 -
2.5.4	MRCK alfa	- 25 -
2.5.5	Rekombinantní DNA a fúzní protein	- 26 -
2.5.6	Transfekce	- 29 -
2.5.7	Transfekční postupy	- 30 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 34 -
3.1	Použité chemikálie a přístroje	- 34 -
3.1.1	Činidla, příprava roztoků	- 34 -
3.1.2	Přístrojové vybavení	- 36 -
3.2	Laboratorní postup přípravy vzorků	- 38 -
3.2.1	Fluorescence buněčných lyzátů	- 40 -

3.2.2	Vliv rozpouštědel na fluorescenci buněčných lyzátů	- 40 -
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	- 42 -
4.1	Charakterizace vzorků	- 42 -
4.1.1	KOLONA: Lichrospher RP-Select B (5 µm, 125 cm x 4 mm)	- 42 -
4.1.2	KOLONA: Biospher PSI 100 CN (5 µm, 150 x 4,6 mm)	- 44 -
4.1.3	KOLONA: Biospher PSI 100 C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm)	- 48 -
4.1.4	KOLONA: Ascentis®Express Peptide ES-C18 (2,7 µm, 150 x 3 mm)....	- 49 -
4.1.5	KOLONA: Supelcosil™ LC-SCX (5 µm, 250 x 4,6 mm)	- 49 -
4.1.6	KOLONA: Yarra 3u SEC-4000 (3 µm, 300 x 7,80 mm)	- 51 -
4.1.6.1	Odhad molekulové hmotnosti vzorků.....	- 52 -
4.1.7	KOLONA: BioSep-SEC-s2000 (5 µm, 300 x 7,80 mm).....	- 53 -
4.2	Hmotnostní spektrometrie.....	- 54 -
4.2.1	Optimalizace podmínek pro MS.....	- 54 -
4.2.2	Výsledky měření z HPLC.....	- 56 -
4.2.3	Výsledky měření z MS	- 57 -
4.3	Enzymatické štěpení bílkovin	- 61 -
4.3.1	Pracovní postup úpravy bílkovin.....	- 61 -
4.3.2	Výsledky měření z MS	- 62 -
5	ZÁVĚR.....	- 68 -
6	POUŽITÉ ZDROJE.....	- 69 -

Použité zkratky

AC	afinitní chromatografie
AMK	aminokyselina
BSA	hovězí sérový albumin
DEAE	diethylaminoethyl-
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DTT	D,L-dithiothreitol
ESI-MS/MS	ionizace elektrosprejem s tandemovou hmotnostní spektrometrií
FD	fluorescenční detekce
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GFP	zelený fluorescenční protein
HeLa	označení lidské epiteliární buňky Henrietty Lacks
HIC	hydrofóbní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IAA	jodacetamid
IEC	iontově výměnná chromatografie
IRE element	iron responsive element
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LTQ	lineární iontová past
MALDI-TOF	ionizace laserem za účasti matrice v kombinaci s průletovým analyzátozem
MRCK alfa	Myotonic Dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha
MS	hmotnostní spektrometrie
PAGE	polyakrylamidový gel
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
RPC	chromatografie s reverzními fázemi
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	gelová elektroforéza

SEC	vylučovací chromatografie
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
UV	spektrofotometrická detekce v ultrafialové oblasti
VIS	spektrofotometrická detekce v oblasti viditelného spektra

Seznam obrázků

- Obr. 1 Barevné varianty GFP fúzované s proteiny exprimujícími se v jednotlivých částech buňky
- Obr. 2 Schéma přípravy rekombinantního vektoru (plazmidu)
- Obr. 3 Schéma vzniku fúzního proteinu
- Obr. 4 Transfekce pomocí lipofekčních postupů
- Obr. 5 Fluorescence vzorků v jednotlivých typech rozpouštědel
- Obr. 6 Naměřené chromatogramy jednotlivých vzorků pomocí fluorescenčního detektoru
- Obr. 7 Analýza směsi standardních bílkovin pomocí UV detektoru
- Obr. 8 Výsledek měření vzorku 1 pomocí MS
- Obr. 9 Výsledek měření vzorku 2 pomocí MS
- Obr. 10 Výsledek měření vzorku 3 pomocí MS
- Obr. 11 Výsledek z internetové databáze potvrzující přítomnost trypsinu v biologickém vzorku obsahující GFP
- Obr. 12 Výsledek z internetové databáze potvrzující přítomnost ovalbuminu
- Obr. 13 Výsledek z internetové databáze potvrzující přítomnost BSA

1 ÚVOD

MRCK alfa (Myotonic Dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase **alpha**) je serin-threoninová proteinová kináza. Podílí se na regulaci buněčného cytoskeletu. Lokalizuje se do míst membránových protruzí a je důležitá pro tvorbu proteinových komplexů asociovaných s receptory, které se vážou k extracelulární matrix. Ta tvoří mikroprostředí nezbytné pro proliferaci a diferenciaci buněk včetně vytvoření a udržení nik kmenových buněk, morfogenezi, tkáňovou remodelaci a hojení. Niky kmenových buněk jsou stromální buňky, extracelulární proteiny tvořící podpůrnou síť a gradient růstových faktorů. Kmenové buňky sídlí v těchto nikách a kontakt s nimi je determinuje, zda se mají dělit, diferencovat do krevních buněk nebo migrovat do jiných míst krvetvorné tkáně. Změny v deregulaci buněčného cytoskeletu vedou zároveň ke změnám v proliferaci a invazivitě, selhání buněčné smrti a ztrátě diferenciace. Tyto změny jsou spojené s vrozenými vývojovými vadami a patologickými procesy jako jsou fibróza a rakovina. Objasnění molekulární úlohy kinázy MRCK alfa v regulaci cytoskeletu a změn s ním spojených by tak výrazně napomohlo rozvoji nových léčebných postupů a využití inhibice kinázy v klinické praxi.

Vzhledem k možné rozsáhlosti působení MRCK alfa musí existovat další, doposud neidentifikované cytoskeletární proteiny a bílkoviny zajišťující propojení mezi jednotlivými regulačními dráhami. Dá se předpokládat, že substrátů pro fosforylaci MRCK alfa je více, než kolik jich bylo doposud popsáno v literatuře. Jednou z možností, jak takovéto proteiny identifikovat, je pokusit se o nativní separaci a izolaci proteinového komplexu obsahujícího MRCK alfa. Vhodnou značkou pro snadnou detekci MRCK alfa je fluorescenční protein kovalentně připojený k této kináze. Pokud by se našla vhodná metoda a podmínky pro izolaci proteinových komplexů v nativním stavu, bylo by možné na základě pozitivní fluorescence odseparovat právě komplex obsahující MRCK alfa a následně identifikovat jednotlivé proteiny.

Na této diplomové práci jsem spolupracovala s Mgr. Pavlínou Ptáčkovou, jež v současné době pracuje na ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT). Její činnost spočívala v přípravě a poskytnutí vždy nových vzorků dle mých potřeb pro následující měření. Hlavním úkolem této práce bylo analyzovat proteinový lyzát obsahující kinázu MRCK alfa, která je zfúzovaná s GFP za použití kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a v případě úspěchu následně odseparovat frakci s tímto proteinem. Současně bylo nutné zjistit, zda se

v připravovaných vzorcích vůbec nachází proteiny MRCK alfa a GFP. Měření, jejichž cílem bylo zjištění reálného obsahu látek ve vzorcích, jsem prováděla metodou hmotnostní spektrometrie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 HPLC

V současné době jsou nejvíce využívány tři typy kapalinové chromatografie: nízkotlaká kolonová kapalinová chromatografie, planární chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC představuje pokročilou a instrumentálně náročnou techniku kapalinové chromatografie, řadíme ji mezi moderní separační techniky a zaujímá hlavní postavení v současné analytické chemii. Tato technika byla vyvíjena z metodiky plynové chromatografie. Chceme-li dosáhnout vysoké účinnosti separačního procesu této metody, musíme použít takovou stacionární fázi, která by obsahovala hlavně malé částice. Částice by měly splňovat dvě základní podmínky. Měly by být stejně velké a mít pravidelný tvar a tím budou homogenně vyplňovat příslušnou kolonu. Pohyb mobilní fáze kolonou se zprostředkovává prostřednictvím bezpulzních vysokotlakých čerpadel a proto se tato technika někdy označuje jako vysokotlaká kapalinová chromatografie. Abychom dosáhli průtoku mobilní fáze v řádech ml/min, je nutné použít přetlak jednotek až desítek MPa.

Jako každá technika, tak i HPLC má své určité výhody a zároveň i nedostatky. Mezi její přednosti bezpodmínečně patří úspora času a bohatá oblast aplikovatelnosti. Pomocí HPLC jsme schopni analyzovat ionty, látky polární a nepolární, látky málo těkavé nebo látky, které jsou tepelně nestabilní, ale i látky s vysokou molární hmotností. Další výhodou, kterou lze zmínit, je možnost ovlivnit separaci složením mobilní fáze. Při manipulaci s HPLC systémem si vystačíme s malým množstvím vzorku, pohybujeme se v řádech mikrolitrů a nabízí se zde možnost využití přímého nástřiku analytu na kolonu. Mezi hlavní nevýhody tohoto systému řadíme především náročnější instrumentaci a složitější mechanismus separace. I přesto se stává naším častým a vyhledávaným pomocníkem v laboratoři [1-3].

2.1.1 Trendy v oblasti HPLC

Obecně každá analytická separační technika v sobě skrývá rozsáhlé aplikační možnosti a potenciál dále se rozvíjet. V současnosti je největší pozornost věnována právě v oblasti technik HPLC, i přesto, že se dá považovat tato technika za analyticky vyspělou, neboť její teorie je již dokonale zpracována a aplikace HPLC jsou stručně popsány. Mezi nejdůležitější cíle v HPLC patří postupné zkracování kolon, a tím pádem i zmenšování velikosti částic

sorbentu. Správná volba kolony je rozhodující pro úspěch v HPLC, neboť je považována za „srdce chromatografu.“

Při minituarizaci separačních kolon je hlavní důraz směřován na jednoduchost při jejich přípravě tak, abychom zachovali stejnou separační účinnost kolon, které mají klasické rozměry. Také z původní velikosti stacionární fáze 5 μm se dnes postupně dostáváme na hodnotu velikosti částic 3 μm . Řada komerčních firem nabízí sorbenty s velikostí částic dokonce i pod 2 μm . Tyto dva děje jsou spolu úzce spojené a jejich výsledkem je zkrácení doby analýzy, což umožňuje velmi rychlou diagnostiku a provedení většího počtu analýz za časovou jednotku nebo zlepšení detekčních limitů. Mezi další současné trendy v HPLC patří zmenšení vnitřního průměru kolon. Klasický průměr separačních kolon je přibližně 4,6 mm. Od této hodnoty se již ustupuje a aktuální průměr vyráběných kolon se pohybuje v rozmezí 3-4 mm. V technice LC-MS (kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí) jsou k dispozici kolony s vnitřním průměrem menším než 2 mm. Důvodů, proč se v LC-MS využívají kolony s takto malým průměrem je mnoho. Jednak to souvisí s rychlostí analýzy, dále je snaha zabudovat ekologický a ekonomický provoz chromatografických laboratoří a v neposlední řadě dochází ke snížení spotřeby činidel a rozpouštědel používaných jako mobilní fáze. Mezi další trendy se řadí úplná minituarizace celého separačního systému, je kladen obrovský důraz na automatizaci analýz, využití ultravysokých tlaků v chromatografii a stále vzrůstá význam používání techniky LC-MS.

Větší perspektivu modernizace HPLC představuje používání chromatografických mikrofluidních čipů s MS detekcí. Čip napodobuje chromatografickou kolonu, spojovací kapiláru a nanoelektrosprej. Mezi výhody čipové technologie patří především jednoduché zacházení a lze ji aplikovat na analýzu peptidů, fosfopeptidů či malých molekul.

Vývoj těchto separačních analytických metod, které kráčí cestou minituarizace a jejichž spojení s nějakým moderním, citlivým detekčním zařízením není u konce, i přesto, že současné techniky jsou dostatečně citlivé, selektivní, účinné a neohrožující životní prostředí. Stále bude probíhat jejich zdokonalování. Jedná se tedy o nepřetržitý a neustále se rozvíjející proces [4-7].

2.1.2 Spojení s hmotnostní spektrometrií

Byl zaznamenán obrovský průlom přímého spojení separační techniky s technikou spektrální, což výrazně zvyšuje selektivitu. V jedné analýze můžeme tedy spojit dva probíhající děje, separaci a identifikaci jednotlivých komponent vzorku ve složité matici, k tomu využíváme výhody obou technik. Velmi rozšířená technika takového spojení je plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). GC/MS pro svůj velký úspěch vyvolala myšlenku a rozvoj technicky náročnějšího uspořádání, tj. HPLC/MS (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií). Mezi hlavní problémy spojení HPLC/MS patřilo odstranění velkého množství mobilní fáze a převedení separovaných látek do plynné fáze.

Rozsah využití MS zahrnuje různé povrchové analýzy, organické strukturní analýzy, prvkové anorganické analýzy až po sekvence biopolymerů. Hlavním těžištěm v analytické oblasti je pak zvláště stopová analýza organických látek s cílem zjistit jejich strukturu. Hmotnostní spektrometr není pouze analytickým přístrojem, ale zároveň dokáže studovat chemii v plynné fázi nebo chemii povrchů. Mezi analytickými technikami drží MS zvláštní místo, neboť měří vnitřní vlastnosti molekuly s velmi vysokou citlivostí.

Přístrojové vybavení MS prošlo v posledních letech velmi rychlým vývojem až do své nynější podoby, což má za následek komerční dostupnost těchto strojů v přijatelných cenových rozmezech pro většinu chemických laboratoří. Stávají se prakticky nedílnou součástí každé analytické laboratoře, pro svoji dobrou vypovídací schopnost jsou na nich prováděny rutinní analýzy. Oblast aplikovatelnosti je značně rozsáhlá a v podstatě ve všech oblastech chemické analýzy se setrhneme s použitím obou těchto metod [2, 8-14].

2.2 Proteomika

Živá hmota představuje po chemické stránce soubor různých látek a mezi ty nejdůležitější řadíme právě bílkoviny. Proteiny jsou biologické makromolekuly a mají dobře definované fyzikálně chemické vlastnosti. Účastní se všech biochemických pochodů a jejich funkční univerzálnost je dána strukturou. Základními jednotkami proteinů jsou aminokyseliny, z nichž jsou jednotlivé proteiny syntetizovány [15-16].

Veškeré proteiny, které jsou součástí buněčných struktur a obstarávají funkce buňky (převádění a zpracování biologické informace, výměna látek a energie), označujeme termínem proteom. Posléze tak vznikl nový obor proteomika [17]. Existuje celá řada slovních spojení, které popisují definici proteomiky. Za jednu z nejlepších je považována ta, která říká, že se jedná o obor zabývající se systematickou analýzou bílkovin z hlediska jejich identifikace, množství a funkcí [18]. Mezi hlavní cíle proteomiky patří popis a objasnění úloh bílkovin v procesech probíhajících v organismech (zdravá či nemocná buňka, tkáň). Do těchto procesů lze zařadit identifikaci bílkovin zahrnující určení molekulové hmotnosti, sekvence aminokyselin, stanovení heterogenity a posttranslační modifikace, dále se určuje interakce bílkovin s jinými látkami a změny složení bílkovin během biologických procesů.

Oblast aplikovatelnosti proteomiky je značně rozsáhlá. Uplatnění nachází v medicíně, kdy slouží ke studiu příčin a mechanismů chorob či nalezení markerů patologických onemocnění. Ve farmacii je využívána k hledání a vývoji nových léčiv. Dále lze proteomiku uplatnit i v potravinářství, kdy se sleduje kvalita a bezpečnost potravin nebo nově zaváděné výrobní procesy a v neposlední řadě v průmyslu, zemědělství a ochraně životního prostředí.

Proteomika produkuje stále více data o bílkovinách v komplexech, buňkách, organelách, tkáních, ale i celých organismech. Zároveň probíhá proces vytváření a zdokonalování proteomické techniky. Její vývoj vede stále k citlivějším technikám a umožňuje tak identifikaci a charakterizaci bílkovin v nízkých koncentracích [17-19].

Klasický postup proteomické analýzy lze shrnout do několika základních kroků. Nejprve je potřeba oddělit proteinovou frakci z biologického materiálu (srážení a denaturace). Následuje enzymová hydrolýza jednotlivých bílkovin, nejčastěji pomocí trypsinu. Poté proběhne separace peptidových štěpů vzniklých hydrolýzou prostřednictvím separační metody ve spojení s MS. Poslední částí této analýzy se stává vyhledávání struktury bílkovin v databázi sekvencí podle molekulové hmotnosti peptidových štěpů. Zásadním krokem při proteomických studiích se stává separace peptidů, které vznikly enzymatickým štěpením pomocí trypsinu. Abychom dosáhli vysoké účinnosti peptidového mapování, je nutné použít kombinaci separační metody s výkonnou detekční technikou, jakou je právě hmotnostní spektrometrie. I záměna jedné aminokyseliny v sekvenci proteinů či peptidů může způsobit změnu jejich struktury a výrazně tím ovlivní příslušné biologické funkce proteinu [20-21].

2.3 Metody stanovení bílkovin

Pro analýzy proteinů a peptidů jsou k dispozici různé techniky, mezi nejpoužívanější řadíme chromatografické a elektroforetické separační metody využívající odlišné principy separace. Jejich kombinací lze získat spolehlivé a nezkreslené výsledky o analyzovaných proteinech. V následujících kapitolách jsou uvedeny konkrétní metody pro dělení. Větší důraz je kladen na chromatografické techniky, jejich použití bylo zadáním této diplomové práce [21].

2.3.1 Chromatografické metody

HPLC je nutnou součástí systému pro purifikaci a charakterizaci makromolekul a správný výběr chromatografické metody závisí na typu sledované molekuly a účelu. V současné době lze využít několik základních modelů HPLC, mezi ně patří vylučovací chromatografie (SEC), iontově výměnná chromatografie (IEC), chromatografie s reverzními fázemi (RPC), hydrofóbní interakční chromatografie (HIC) a afinitní chromatografie (AC) [20, 22].

Technika SEC odděluje biomolekuly na základě rozdílů v jejich molekulární velikosti. Využívá nerozpustný porézní gel jako stacionární fázi. Materiálem plnění bývají organické polymery, lze také použít rigidní porézní skla a silikagel. Mobilní fáze musí splňovat několik požadavků: musí rozpouštět separované analyty, nesmí docházet k její reakci se soluty a stacionární fází a dále musí být kompatibilní s detektorem. SEC je založena na síťovém efektu, není zde interakce mezi sloučeninami vzorku a obalovým materiálem kolony. Místo toho molekuly difundují do pórů porézního média a jsou od sebe odděleny v závislosti na jejich velikosti vzhledem k velikosti pórů. V případě molekul, které jsou větší než je velikost pórů, nedochází k jejich difuzi. U menších molekul dochází k jejich difuzi, jsou bržděny interakcí s póry gelu a jsou tak od sebe odděleny. Z toho vyplývá, že velké molekuly eluují jako první a menší molekuly se v koloně zdržují a eluují v pozdějším čase. Používají se výhradně dlouhé kolony, neboť mají omezenou kapacitu. Kromě separace proteinů lze tuto metodu dále použít pro zjištění charakteru polymeru či oddělení nízkomolekulárních látek od vysokomolekulárních [21-25].

Mód IEC odděluje biomolekuly (proteiny, polypeptidy, nukleové kyseliny, polynukleotidy, sacharidy) na základě jejich rozdílných nábojů. Jako stacionární fáze se používá granulovaný iontoměnič, na němž jsou navázané funkční skupiny kationogenní ($-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$) nebo

anionogenní ($-\text{NH}_2$). Iontově výměnné stacionární fáze bývají silikagely nebo materiály obsahující organické polymery. IEC pracuje na základě elektrostatických či iontových interakcí mezi funkčními skupinami měniče a nabitými analyty v mobilní fázi. Všechny proteiny mají na svém povrchu náboj, který umožňuje jejich interakci s iontoměničovou stacionární fází, a tak separace proteinů probíhá na základě jejich afinity ke stacionární fázi. Přítomnost funkčních skupin ve struktuře proteinů dává proteinům celkový kladný či záporný náboj. Tento náboj závisí na izoelektrickém bodě daného proteinu a na pH v okolním prostředí. Při zvoleném pH budou některé proteiny kladně nabitě, jiné zas nabitě záporně. A právě tato vlastnost je využívána při jejich separaci. Hlavní oblast aplikovatelnosti IEC je purifikace bílkovin. Technika je také velmi vhodná pro separaci anorganických či organických kationtů a aniontů ve vodných roztocích. Jedná se o metodu alternativní k RPC pro dělení peptidů a proteinů [21-22, 24-26].

RPC je velmi silnou a účinnou technikou pro analýzu, identifikaci a čištění proteinů, peptidů či peptidových směsí. Své uplatnění nachází nejen v analytických laboratořích, ale i v biofarmaceutickém průmyslu. Stále více jsou produkována peptidová a proteinová léčiva a tak peptidové mapování zaujímá základní metodu identifikace léčiv bílkovinné povahy. Tato technika může být rovněž použita pro nepolární, polární, ionizovatelné a iontové molekuly. Jedná se o velmi populární způsob, více jak 90 % chromatografických uživatelů využívá této varianty. Mechanismus dělení probíhající v RPC představuje kombinaci tří interakcí: interakce analyt-mobilní fáze, mobilní-stacionární fáze a distribuce analytu mezi mobilní a stacionární fází. V módu RPC se používá chemicky vázaná nepolární stacionární fáze. Ta má řadu výhod, mezi které patří dostupnost fází s velkým rozsahem polarity, jejich dostatečná čistota, široká oblast aplikací, rychlé ustavení rozdělovací rovnováhy. Nejvíce používaný typ je C18, kde jsou na silikagelových částicích vázány molekuly oktadecylsilanu. Mobilní fáze je polární, vzhledem k jejich vysoké eluční síle se k separaci používají alkoholy, nitrily či ethery v kombinaci s vodou [1, 21, 26].

HIC technika se stává velmi nepostradatelnou při separacích proteinů a velkých peptidů. Její hlavní výhoda spočívá v minimalizaci rizika denaturace bílkovin. Separační mechanismus je obdobný s technikou RPC, tedy dělení závisí na interakci nepolární stacionární fáze a hydrofóbní částí analyzovaného proteinu či peptidu. Přesto existují odlišnosti mezi těmito dvěma metodami. Vzájemně se liší používanými sorbenty, kde nosič stacionární fáze HIC obsahuje méně hydrofóbní ligandy než RPC. Další vlastností bývá hustota vázaného ligandu

na nosič, kde podstatně nižší zaplnění nosiče zaujímá HIC. Posledním rozdílem od RPC bývá aplikace vodné mobilní fáze s vlastnostmi vysoké iontové síly a neutrálního pH. Při RPC jsou používány mobilní fáze s nízkým pH a s přísadami organických rozpouštědel.

Princip AC spočívá ve schopnosti separovaných biomolekul se pevně, specificky a reverzibilně vázat na komplementární látky. Tím mohou být jejich různé substráty, kofaktory, receptory, prostetické skupiny nebo protilátky. Správné dělení příslušných biomolekul závisí na jejich konformaci a afinitě k ligandu, který se nachází na vhodném nosiči. Vhodným nosičem může být silikagel nebo syntetické hydrofilní gely a je umístěn v chromatografické koloně. Volba ligandu je hlavním krokem vedoucím k úspěchu či neúspěchu dané separace tohoto typu chromatografie. Obecně lze tuto techniku považovat za jednu z nejspecifičtějších dělicích metod. Je vysoce selektivní, dokáže separovat složité proteinové směsi a je také velmi důležitá při studiu interakcí mezi bílkovinami. Značnou nevýhodou AC je nízká kapacita a příliš vysoký finanční obnos nutný pro zakoupení afinitních nosičů [21-22].

2.3.2 Elektroforetické metody

Vedle chromatografických metod lze k dělení proteinů a peptidů využít rovněž elektromigrační techniky. Dělení těchto látek probíhá v prostředí, kde je aplikováno elektrické napětí. Analyty získávají rozdílnou elektroforetickou pohyblivost vlivem velikosti svého náboje, velikosti a tvaru molekuly nebo povahy nosiče ve stejnosměrném elektrickém poli. Mezi metody dělení proteinů patří gelová elektroforéza ve sloupcích (trubičkách) nebo v plošném uspořádání. Zařízení gelové elektroforézy v plošném uspořádání (SDS-PAGE) se skládá ze dvou skleněných desek, mezi nimiž je umístěn polyakrylamidový gel (PAGE). Negativně nabitý detergent dodecylsulfát sodný (SDS) slouží k denaturaci proteinů a peptidů. Poté mají denaturované bílkoviny stejný negativní náboj a rychlost pohybu v gelu je určována na základě velikosti molekuly. SDS-PAGE lze uspořádat v jedno či dvou-dimenzionálním uspořádání. Elektroforéza probíhající v gelu je snadná a lehce dostupná, nicméně nelze výsledky kvantitativně vyhodnocovat a je také nesnadné ji automatizovat. Z uvedených důvodů je vhodné provádět příslušné separace proteinů v kapilárním uspořádání, kde uživatel ocení především podstatně vyšší rychlost analýzy. Mezi elektroforetické metody probíhající v kapilárách patří kapilární zónová elektroforéza, kapilární gelová elektroforéza, dále

micelární elektrokinetická chromatografie, kapilární izoelektrická fokusace a také lze využít kapilární elektrochromatografii [20-21, 25, 27].

2.4 Detekce bílkovin

Detekce představuje klíčovou záležitost celé separace bílkovin. Výběr vhodné detekční techniky souvisí s konkrétním typem použité separační metody. V této diplomové práci byly použity celkem tři způsoby detekce: UV detekce, fluorescenční detekce a MS.

UV detekce v ultrafialové oblasti při vlnové délce 210 až 220 nm, což představuje oblast absorpce peptidových vazeb, se stává nejpoužívanější detekční technikou pro peptidy a proteiny separované pomocí HPLC. Hlavní výhodou této metody je, že je nedestruktivní [22, 27].

Mé studované analyty, obsahující bílkoviny, v sobě mají vlastnost přirozeně vykazovat fluorescenci, proto byl k jejich detekci použit především fluorimetrický detektor. Ve srovnání se spektrofotometrickými detektory nabízejí fluorescenční detektory vyšší citlivost a selektivitu, což také umožňuje kvantifikovat a identifikovat sloučeniny nebo nečistoty v komplexních matricích při extrémně nízkých koncentracích. Jak vyplývá z názvu, fluorescenční detektory jsou založené na principu fluorescence a měření emisního záření, které analyt produkuje, jakmile dojde k absorpci primárního excitačního záření. V tomto okamžiku se molekuly látky dostávají do různých vibračních hladin excitovaného singletového elektronového stavu. Molekula, která je excitována, má poté k dispozici několik možností, jak s absorbovanou energií dále pracovat. První možností je vyzáření absorbované energie jako fluorescenci, dále je možné předání jiným molekulám a nebo přeměna na energii vibrační. Excitujícím zářením o určité vlnové délce ze zdroje je tedy analyt ozařován. Poté v kolmém směru k paprsku budícího záření je měřeno fluorescenční záření. Zařízení pro fluorimetrický detektor obsahuje dva monochromátory, pomocí nichž se nastaví námi zvolené vlnové délky budícího a fluorescenčního záření [2, 26-28].

Metodou MS lze získat informace nejen o molekulové hmotnosti daných látek, ale i jejich totožnost odpovídající aminokyselinovým zbytkům. Tento způsob detekce dosahuje citlivosti v řádech pikomolů. Vhodnou ionizační technikou, která se používá při mapování peptidů, se stává termosprej (zahřátím rozpouštědla dojde k vytvoření spreje, jehož chemická ionizace realizuje vznik iontů), elektrosprej (ze vzorku je oddělena kapka pomocí vkládaného

vysokého napětí a po odpaření mobilní fáze se příslušná kapka rozkládá na menší nabité kapičky), bombardování rychlými atomy (v málo těkavém rozpouštědle je rozpuštěn peptid, který je následně ozářen atomy argonu nebo xenonu) nebo MALDI (využívá zabudování peptidu do matrice a při jejím odpaření následně dochází k desorpci a ionizaci studované látky). V proteomických studiích MS se většinou upřednostňují dva typy instrumentace: MALDI-TOF a ESI-MS/MS. Tyto dva typy pracují zcela rozdílným způsobem, avšak vzájemně doplňují získané informace. Nejlépe vybavené proteomické laboratoře mají oba tyto typy nástrojů k dispozici [19-20, 27].

2.5 Příprava buněčného lyzátu obsahujícího GFP-MRCK alfa

Ve svých měřeních pro diplomovou práci jsem pracovala se třemi typy biologických vzorků. Prvním vzorkem byla negativní kontrola. Jedná se o buněčný lyzát připravený z HeLa buněk. Tento buněčný lyzát obsahuje všechny proteiny exprimované v tomto typu buněk, včetně proteinu MRCK alfa. Přítomné proteiny označujeme jako endogenní, neboť jsou buňce vlastní. Další vzorek, který jsem také měla k dispozici, opět obsahoval stejné proteiny jako negativní kontrola, ale navíc byl obohacen o protein GFP-MRCK alfa. Příslušný protein se v buňkách za normálních okolností nevyskytuje, do buňky byl vnesen prostřednictvím genových manipulací, proto ho označujeme názvem exogenní. Třetí vzorek rovněž obsahuje buněčné proteiny a exogenní protein GFP (zelený fluorescenční protein). Nyní bude práce soustředěna na literární přehled a teorii k samotné přípravě buněčného lyzátu.

2.5.1 Buněčná linie HeLa

Řada lékařských výzkumníků experimentuje převážně s laboratorně pěstovanými lidskými buňkami, neboť jejich použití směřuje k pochopení složitosti správného fungování buněk a k naučení se obecné manipulace s buňkami, testování různých zkušebních teorií o příčinách a léčbě nemocí. V podstatě jsou buněčné linie nesmrtelné, neboť mohou neomezeně růst. Také je možné je zmrazit a uchovávat pro případné další testování až několik desítek let. Až v roce 1951 vědec a lékař John Hopkins ustanovil první nesmrtelnou lidskou buněčnou linii ze vzorku tkáně, který byl odebrán mladé ženě černošského původu s nálezem rakoviny děložního čípku. Posléze tyto buňky dostaly své označení jako HeLa buňky. Buňky se staly

velmi rychlým a neocenitelným nástrojem pro lékařské výzkumy a jejich dárce zůstal záhadou po celá desetiletí. V nynější době je již znám celý příběh i jméno mladé ženy. HeLa buňky jsou lidské epiteliární buňky izolované z již zmíněného nádoru ženy jménem Henrietta Lacks. Označení HeLa je tedy odvozeno od prvních dvou písmen z jména a příjmení této paní. Henrietta Lacks byla farmářka pocházející z jižní Virginie, která onemocněla touto rakovinou ve svých 30 letech. A právě lékař John Hopkins vzal bez jejího vědomí část nádoru, který poslal do vědecké laboratoře. Z této skutečnosti vychází podstata jejich extrémní důležitosti. Jedná se o buňky, které jsou nesmrtelné a pěstované v kultuře vůbec. V dnešní době jsou HeLa buňky stále využívány při klonování, genovém mapování a *in vitro* fertilizaci. Zároveň se staly nezbytnou součástí pro rozvoj vakcíny proti obrně. Lidé si nechtějí uvědomit, že tkáňové kultury nejsou špatné. Dnešní medicína závisí pouze na těchto tkáňových kulturách. HIV testy, mnohé základní léky, vakcíny – nic z toho bychom neměli v současnosti běžně k dispozici, kdyby vědci neprováděli sběr lidských buněk a jejich pěstování v kulturách za laboratorních podmínek a neprováděli na nich dostatek experimentů [29-30].

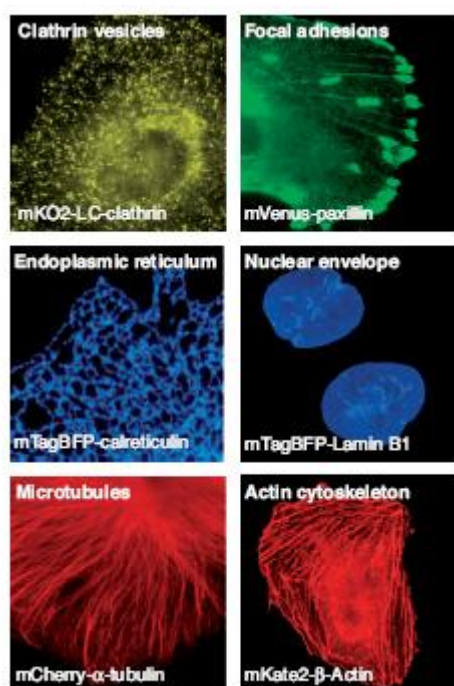
2.5.2 GFP

Objev GFP v 70. letech předznamenal novou éru v buněčné biologii a za posledních 10 let došlo k jeho neuvěřitelně rychlému vývoji. GFP se dokázal proměnit z téměř neznámého proteinu do běžně používaného nástroje, který nachází uplatnění především v oblastech molekulární biologie, medicíně nebo právě v buněčné biologii. Zde má své hlavní postavení ve studiu určitého genového produktu, se kterým se GFP váže. Genový produkt se poté snadno v buňce lokalizuje pomocí fluorescenční mikroskopie na základě fluorescence, kterou vykazuje GFP. Jakmile dojde k navázání proteinu k cílové struktuře genového produktu, je nutné ověřit správnou funkci této struktury. Vazba GFP může v některých případech způsobit její změnu či definitivní zničení. Pomocí této schopnosti je možné provádět studie dělení rakovinných buněk či sledovat vývoj neuronů. Zároveň je velmi jednoduché zjistit, kde se GFP nachází v daném okamžiku. Stačí použít ultrafialové světlo a GFP se rozsvítí jasně zeleně. V biochemii a molekulární biologii je často využíván jako reporterový gen, pomocí něhož můžeme provádět vizualizaci exprese proteinů či testovat jejich různou lokalizaci. Dále může být GFP využíván jako biologický indikátor nádorových buněk k ověření tumorové progresu a umožňující detekci metastáz. To je přínosné zejména vzhledem k jeho stabilitě a skutečnosti, že chromofor GFP je tvořen v autokatalytické cyklizaci, která nevyžaduje

kofaktory nebo substráty. To umožnilo řadě vědců používat GFP v živých systémech a následně to vedlo k jeho rozšířenému používání v buněčné dynamice či vývoji nových studií. V roce 1994 bylo provedeno naklonování tohoto proteinu a nyní se nachází téměř ve všech laboratořích po celém světě. Pravý význam GFP byl uznán a oceněn až v roce 2008, kdy Nobelův výbor udělil Osamu Shimomura, Marty Chalfie a Roger Tsien Nobelovu cenu za chemii, konkrétně za objev a rozvoj zmíněného GFP. Osamu Shimomura se podílel na izolaci této látky z medúzy a objevil její fluorescenční schopnosti. Marty Chalfie přispěl poznatkem o navázání GFP na různé druhy proteinů a Roger Tsien objasnil detaily fluorescence a zjistil existenci různých variant GFP.

Původní GFP (wild-type) byl objeven kolem roku 1960, když vědci studovali bioluminescenční vlastnosti medúzy *Aequorea victoria*. Následně se podařilo zjistit, že GFP je součástí této medúzy, která žije v chladných vodách severozápadního Pacifiku. Byla také objasněna jeho dlouholetá existence v tomto jediném druhu medúzy, což je řádově více než 160 miliónů let. Tento nález byl potvrzen i v jiných početných organismech, než jen v medúze, např. hmyz, ryby, mořské kaktusy, škeble nebo krevety. Bioluminescence představuje proces, při kterém je viditelné světlo emitováno organismem jako výsledek chemické reakce. Reakce zahrnuje oxidaci substrátu nazývaného luciferin a tato oxidační reakce je katalyzována enzymem luciferázou. Medúza *Aequorea victoria* obsahuje bioluminescenční protein, který nese název aequorin. Aequorin se vyznačuje schopností vyzařovat modré světlo. Toto emitované modré světlo GFP absorbuje a následně vysvítí světlo zelené, což je barva, kterou pozorujeme, když medúzy svítí. Procesu bioluminescence v medúze se účastní již zmiňovaný GFP a aequorin, který obsahuje coelenterazin. Po navázání tří Ca^{2+} aequorin oxiduje coelenterazin. To má za následek vznik $\text{Ca}_3\text{-apo-aequorin-coelenteramid}$ komplexu, který *in vitro* emituje modré světlo. V případě *in vivo*, komplex přenáší vyzářenou energii na GFP, který emituje zelenou fluorescenci.

Díky různým mutacím v GFP bylo získáno několik barevných variant. Tyto fluorescenční varianty proteinů (azurová, modrá, žlutá, červená, zelená) se staly užitečným a všudypřítomným nástrojem pro tvorbu fúzních proteinů, kde představují fluorescenční proteinové značky. Dnes je možné vnést tyto varianty do většiny typů živých buněk, kde slouží k neinvazivnímu (nedochází k poškození buňky) fluorescenčnímu značení. Ukázky barevných variant GFP jsou znázorněny na **obrázku 1**.



Obrázek 1 Barevné varianty GFP fúzované s proteiny exprimujících se v jednotlivých částech buňky; převzato z [31].

2.5.3 Chemické vlastnosti GFP

Bez ohledu na původní druhy nebo stupeň genetické manipulace se u všech fluorescenčních proteinů uvádí jednotná velikost. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje kolem 25 000 Da. Molekulová hmotnost GFP se uvádí okolo 30 000 Da, některé literární zdroje však popisují jejich přesnou hodnotu 26,9 kDa. Díky malé velikosti jsou všechny fluorescenční proteiny využívány v mnoha aplikacích, zejména při lokalizaci exprese v živých buňkách. Mezi důležité aspekty GFP je třeba zmínit, že jeho nativní struktura je nezbytná pro rozvoj a údržbu vykazující fluorescence. Denaturace GFP způsobí kompletní zničení jeho fluorescence. Dále se zjistilo, že GFP je složen z 266 aminokyselin. V jeho proteinové sekvenci se vyskytuje všech 20 známých aminokyselin. Při analýzách GFP s použitím fluorescenční detekce bychom nastavili jeho excitační maximum na hodnotu 488 nm, emisní maximum je 507 nm. GFP tvoří typickou sekundární strukturu. Jedná se o strukturu β -skládaného listu, který se skládá z 11 β -řetězců a 6 α -helixů obsahujících kovalentně vázaný chromofor. Chromofor je lokalizován v centru této struktury. Tvoří cis geometrii a je velmi dobře chráněn. Chromofor obsahuje hexapeptidový fragment AMK: Phe64-Ser-Tyr-Gly-Val-

Gln69. GFP je velmi stabilní a odolný vůči teplu, alkalickému pH, různým druhům detergentů, proteázám, organickým a chaotropním solím [31-36].

2.5.4 MRCK alfa

GTPázy řadíme do rodiny Rho proteinů, podílejí se na regulaci procesů souvisejících s buněčnou morfologií a transkripcí. Zároveň ovlivňují řadu procesů, včetně buněčného cyklu, invazivitu, adhezi, exocytózu a endocytózu. Jejich efektem se stávají proteiny nacházející se u všech eukaryotických organismů. Jsou to proteiny, které jsou evolučně velmi staré a konzervované. Některé efekty těchto GTPáz se objevily až v pozdějším stádiu evoluce. Vznik těchto proteinů je pravděpodobně spojován se zvyšující se komplexitou vyšších organismů a je potřeba přítomnost dalších efektorů. Jejich přesná role není však doposud stále objasněna. K těmto proteinům právě patří i serinová/threoninová kináza MRCK alfa. Její oficiální název je CDC42BPA, Myotonic dystrophy kinase-related CDC42-binding kinase. Kináza se poprvé objevuje až u organismu *Caenorhabditis elegans* [37]. Role samotné kinázy MRCK alfa byla prozatím nejvíce studována na modelových systémech buněčných kultur fibroblastů a imortilizovaných T-lymfocytech. S GTPázou CDC42, která MRCK alfa fosforyluje, se podílejí na buněčné migraci, zejména na tvorbě filopodií v procesu invazivity nádorových buněk skrze extracelulární matrix a dále také na tvorbě neuronových výběžků. Přesný mechanismus jejího působení není znám. Pravděpodobně zde hrají důležitou roli další proteiny, které s kinázou interagují, a které doposud nebyly identifikovány [38-42]. Při protruzi a retrakci buněk se výrazně uplatňuje aktinový cytoskelet, který je regulován právě GTPázami. Předpokládá se, že MRCK alfa, jakožto přímý efektor proteinu CDC42, by se tedy mohla na této regulaci podílet. Buněčná mobilita je dále charakterizována polarizací cytoplazmy a jejích komponent ve směru migrace, určením polohy jádra a reorientací Golgiho aparátu a MTOC (microtubule-organizing center) směrem k vedoucímu konci buňky. Pohyb jádra je obvykle řízen aktinovým retrográdním tokem a je závislý na fosforylaci myosinu II, při kterém se MRCK alfa uplatňuje [39, 42]. U *C. elegans* byla popsána role MRCK alfa při fosforylaci serinových a threoninových zbytků lehkého regulačního řetězce myosinu II, která je naprosto nezbytná pro aktivitu a uspořádání myosinu II během embryonálního vývoje *C. elegans* [43]. Velmi pozoruhodným zjištěním je přítomnost IRE elementů (iron responsive element) v 3' nepřekládané oblasti mRNA pro lidskou MRCK alfa [44]. Jedná se o strukturní RNA elementy, které jsou součástí dobře charakterizovaného systému posttranskripční

regulace mRNA pro klíčové proteiny metabolismu železa. Pokud je hladina železa v buňce limitující, dochází ke zvyšování vazebné afinity proteinu k IRE elementu. Vazba proteinu na IRE element zastavuje translaci v 5' nepřekládané oblasti mRNA, zatímco vazba do 3' oblasti stabilizuje transkript. Naopak, zvýšená hladina železa v buňce protein inaktivuje a mRNA společně s IRE elementem je v 5' oblasti snáze translatována. Transkript, který má IRE v 3' oblasti je poté degradován. U člověka, jako jediného organismu, je hladina proteinu MRCK alfa v buňce regulována intracelulární koncentrací železa. Tím je i výrazně ovlivněna role kinázy v regulaci aktinomyosinového cytoskeletu. MRCK alfa se pravděpodobně také podílí na transportu železa v buňce do cílových míst. Byla potvrzena společná lokalizace kinázy s endozomy, které obsahovaly transferinový receptor s navázaným železem. Pohyb váčků v buňce by mohl být zprostředkován přes protein, který s kinázou interaguje, nebo přímo přes její cílový substrát, nejspíše pomocí některých myosinů. Očekáváme, že se MRCK alfa podílí i na transportu dalších molekul do buňky. K objasnění by výrazně pomohl příspěvek nalezení nejen cílových substrátů kinázy, ale i proteinů, se kterými interaguje a které zajišťují funkční propojení mezi jednotlivými regulačními dráhami [45-46].

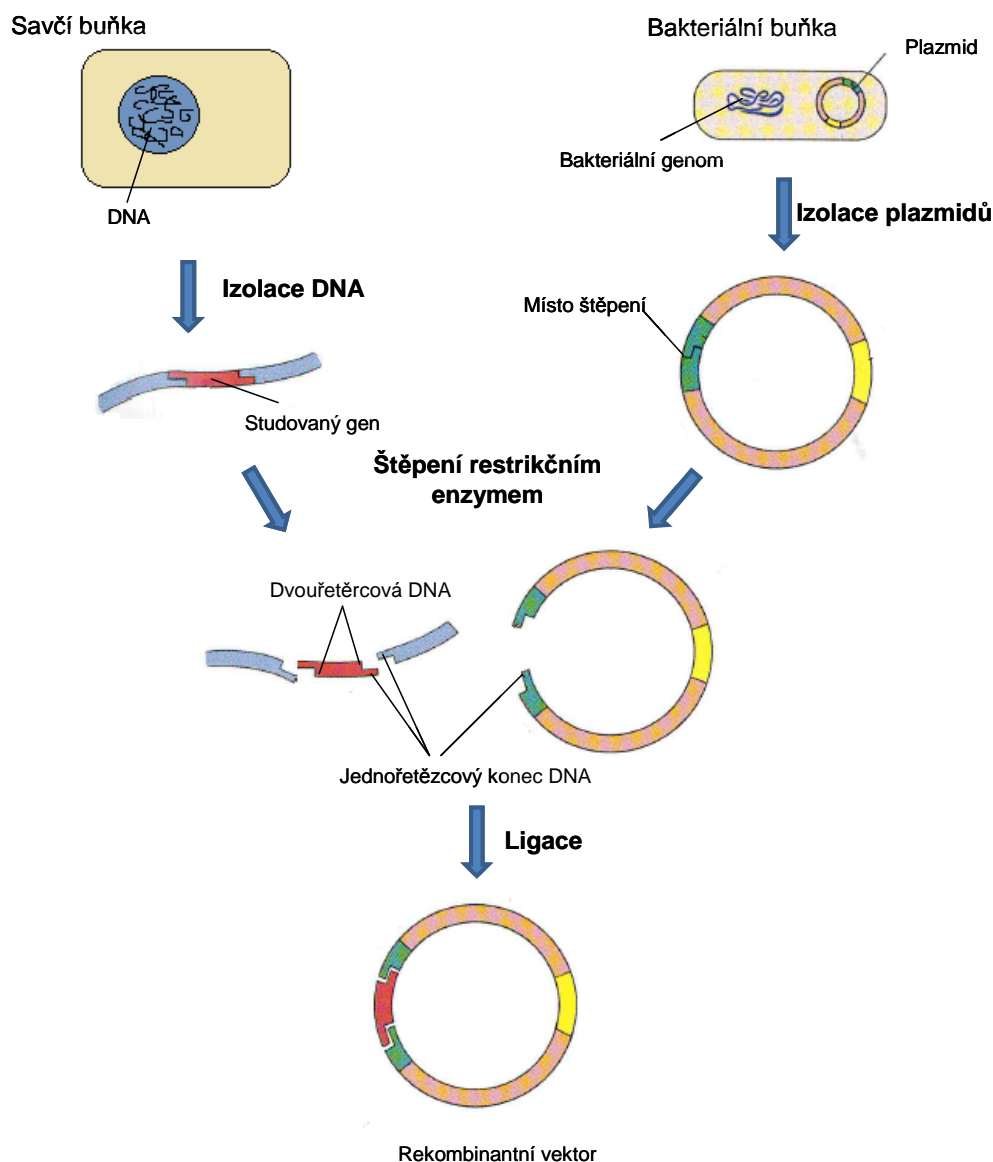
MRCK alfa se skládá z 1732 AMK, proteinová sekvence je známá. Molekulová hmotnost je poměrně vysoká, uvádí se kolem hodnoty 195000 Da. MRCK alfa vytváří v nativním stavu dimery a tetramery, což do jisté míry může komplikovat její identifikaci. MRCK alfa také fosforyluje řadu substrátů, z nichž lze jmenovat podjednotku lehkého řetězce myosinu II, dále fosfatázu MYPT1 (rovněž se uplatňuje při regulaci myosinu II) a v neposlední řadě kinázy, které regulují sestavování aktiniových filament [47-51].

2.5.5 Rekombinantní DNA a fúzní protein

Produkce proteinů GFP a GFP-MRCK alfa v buněčné linii HeLa byla docílena transfekcí rekombinantních plazmidů pomocí lipofekčního činidla. Plazmid je malá kruhová DNA, která se přirozeně vyskytuje u některých bakterií a archebakterií, výjimečně i u eukaryot. Plazmidy nesou genetickou informaci, která ovšem není pro buňku nezbytná, ale za určitých podmínek mohou být plazmidové geny pro buňku výhodné (např. plazmid může nést gen pro rezistenci na antibiotikum). K replikaci a transkripci plazmidů jsou pak využívány enzymy (DNA polymerasa, RNA polymerasa) kódované genomem buňky. Plazmidy jsou v molekulární biologii běžně používané jako nosiče (vektory) genetické informace. Pomocí genových

manipulací je možné do nich vkládat další geny – plazmid se tak stává rekombinantní molekulou.

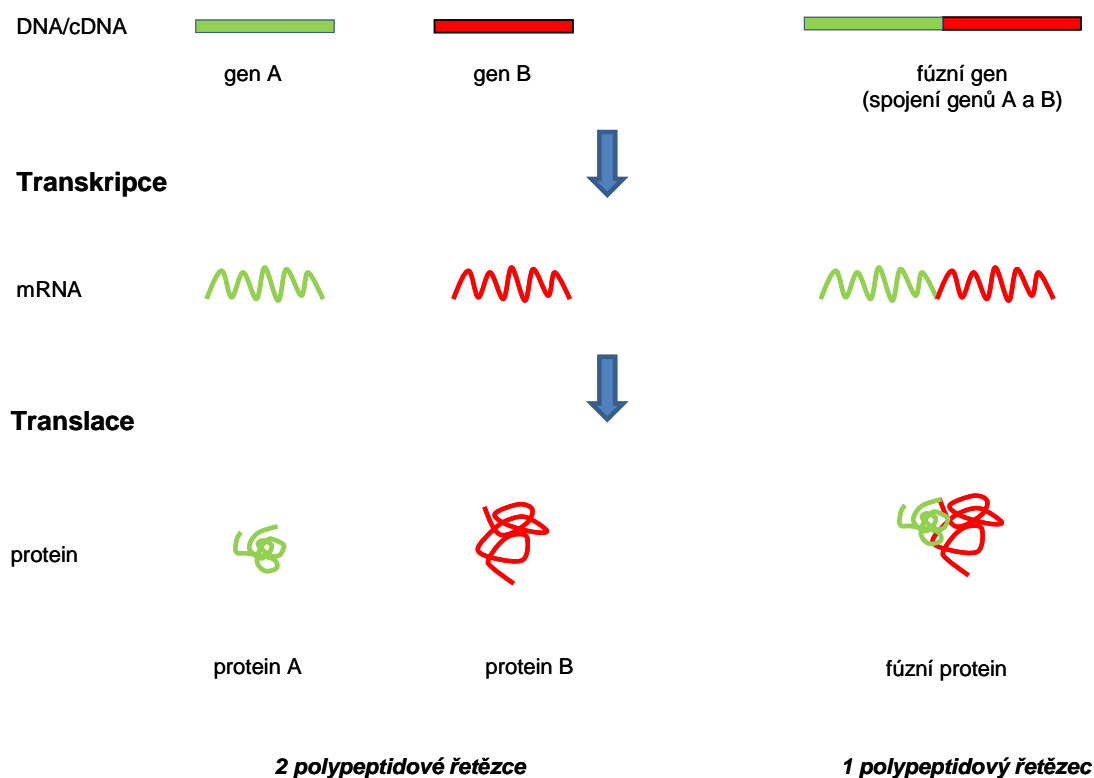
Příprava rekombinantní DNA, jak je naznačeno na **obrázku 2**, začíná tím, že z bakteriálních buněk jsou vyizolovány plazmidy, které jsou v určitých místech naštěpeny tzv. *restrikčními enzymy* (rovněž *endonukleázy*). Tyto enzymy jsou známy zejména u bakterií. Chrání je před cizorodou DNA. Dnes je známo přibližně 2500 různých enzymů. Restrikční enzymy jsou specifické, v molekule DNA rozlišují krátké nukleotidové sekvence, ve kterých štěpí kovalentní fosfodiesterové vazby. Vznikají tak různě dlouhé dvouřetězcové DNA fragmenty, které mají většinou krátké jednořetězcové konce. Tyto konce se pak spojují vodíkovými vazbami s komplementárními konci jiného fragmentu molekuly DNA. Použitím dalšího enzymu *DNA ligázy*, která katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby, mohou být konce dvou vláken spojeny natrvalo. Spojením fragmentů cizorodé DNA a plazmidu izolovaného z bakterií vznikají rekombinantní plazmidy. Plazmidy mohou být poté znovu vneseny do bakterií, které je pomnoží, nebo do dalších hostitelských buněk, včetně savčích.



Obrázek 2 Schéma přípravy rekombinantního vektoru (plazmidu); převzato z [52].

Pro expresi proteinů (transkripce a translace) v buňkách se využívají tzv. expresní rekombinantní vektory. Do těchto vektorů se vkládá konkrétní studovaný gen nebo jeho část, viz **obrázek 2**. V dnešní době se spíše s výhodou používá vkládání tzv. komplementární DNA (cDNA) získané reverzní transkripcí. Reverzní transkripce byla objevena u retrovirů. Jde o proces, při kterém dochází k přepisu genetické informace z ribonukleové kyseliny do deoxyribonukleové. Použitím *reverzní transkriptázy in vitro* lze tak získat z izolované buněčné mRNA komplementární DNA. Tato DNA poté slouží jako kódující sekvence pro rekombinantní protein. Do expresních vektorů se mohou vkládat dva nebo i více genů, které

původně kódovaly jednotlivé proteiny. Spojením těchto genů vzniká tzv. fúzní gen, což je patrné z **obrázku 3**. Jeho expresí vzniká jediný polypeptid s vlastnostmi odvozenými od každého z původních proteinů [52-56].



Obrázek 3 Schéma vzniku fúzního proteinu [vlastní zpracování].

2.5.6 Transfekce

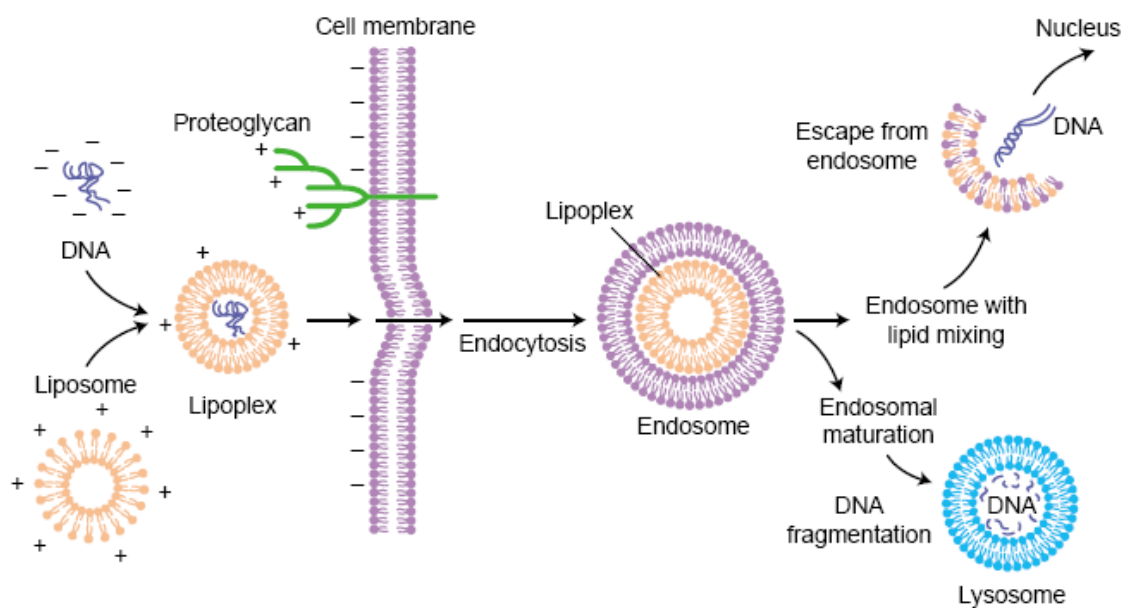
Podle dostupné terminologie znamená pojem transfekce zavedení cizí DNA do jádra eukaryotických buněk, ať už se jedná o buňky adherující nebo suspenzní. Buňky, které mají ve svém jádře takto začleněnou DNA se poté označují termínem transfektní nebo transfekované. Transfekci je možné rozlišit na přechodnou a stabilní. Rozdělení se děje na základě stability přenášeného genu v transfekované eukaryotické buňce. U přechodné transfekce se zdržuje cizorodý gen v hostitelské buňce jen po určitou dobu, protože nedochází ke spojení s chromozomem a jeho replikace není sladěna s replikací genomu, vzhledem k nepřítomnosti potřebných příslušných signálních sekvencí. Při tomto způsobu transfekce je možné dosáhnout na krátký okamžik vysoké exprese přenášeného genu, neboť může docházet

k transfekci jedné buňky několika kopiemi téhož genu. Stabilní transfekce představuje trvalé začlenění cizorodého genu do genomu hostitelské buňky. Stává se tak jeho nedílnou součástí a společně s ním posléze dochází k replikaci. Transfekci je možné ovlivnit řadou faktorů, a proto je nezbytné dodržovat několik zásadních pravidel. Buňky by měly být pěstovány ve vhodných médiích a mít pro svůj růst zajištěny veškeré potřebné faktory. Měli bychom používat výhradně čerstvá média, zvláště pokud obsahují chemicky nestálé látky, jako jsou thiaminy nebo cytokiny. Buněčné kultury musí být bez známek jakékoliv možné kontaminace. Inkubace buněk se provádí při teplotě 37°C s přidavkem 5-10% CO₂ a je nutná přítomnost vysoké vlhkosti vzduchu. DNA se většinou resuspenduje ve sterilní vodě či TE (Tris/EDTA) pufru do konečné koncentrace 0,2-1 mg/ml. Optimální množství DNA použité v transfekci se bude značně lišit v závislosti na typu DNA, typu použitého transfekčního činidla či metody vnesení DNA a v neposlední řadě na počtu buněk [57-58].

2.5.7 Transfekční postupy

Transfekční postupy lze rozdělit na tři základní skupiny: metody biochemické, fyzikální a biologické. Typickým příkladem biochemického transfekčního postupu lze uvést transfekci, která je zprostředkována fosforečnanem vápenatým nebo dietylaminoetyl (DEAE) dextranem, transfekce pomocí polykationtů a lipofekčních postupů. Při použití metody s fosforečnanem vápenatým dochází k tvorbě jemné sraženiny mezi fosforečnanem vápenatým a DNA. Při kontaktu sraženiny s plazmatickou membránou dochází k její internalizaci procesem endocytózy. V buňce se část DNA uvolní do cytosolu, ze kterého následně putuje do jádra. Je popsána široká škála variant této metody, které se od sebe liší. Metodu můžeme do značné míry ovlivnit tím, jakým způsobem vytvoříme příslušnou sraženinu. Snahou je získat takovou sraženinu, která by měla na svém povrchu správnou hrubost. To by mělo za výsledek lepší průběh endocytózy s vyšší účinností za současného zachování životaschopnosti buněčné populace. Mezi další prvky ovlivňující účinnost lze zařadit velikost a koncentraci použité DNA. Platí zde úměra, že čím větší množství vysokomolekulární DNA ve sraženině, tím lépe bude docházet ke zvyšování účinnosti transfekce použitím nízkomolekulárních plazmidových DNA. Dále je velmi důležité použít správné pH a koncentraci vápenatých a fosfátových iontů. Je nezbytné se zde zmínit o výhodách této metody. Mezi ně bezpodmínečně patří vysoká účinnost, která ovšem závisí na typu použitých buněk, dále je možné tuto metodu aplikovat na rozsáhlou škálu jednotlivých typů buněk. Metoda může být použita pro přechodné i stabilní

transfekce, jedná se o levnou metodu. Transfekce, která je zprostředkována diethylaminoethyl (DEAE) dextranem, se rovněž zařazuje mezi biochemické transfekční postupy. Tento typ metody se doporučuje používat převážně u živočišných buněk. DEAE dextran je kationtový polymer, jehož přesný mechanismus působení není doposud známý, existují ovšem jisté předpoklady. Lidé se domnívají, že DEAE dextran, jakožto vysokomolekulární a kladně nabitý polymer, tvoří určitou přepážku mezi negativně nabitými molekulami DNA a negativně nabitým povrchem buňky. Endocytózou je komplex DEAE dextran-DNA přenášen do buňky, kde posléze dochází k postupnému uvolňování DNA z vytvořeného komplexu v okyselujících endozomech a poté se neznámým mechanismem přesouvá do jádra. Ve srovnání s technikou předchozí má tato technika několik zvláštností. Je vhodná zejména pro přechodnou transfekci, nikoliv pro stabilní. Pouze u vybraných buněčných typů probíhá dokonalým způsobem. U ostatních buněčných druhů má podstatně nižší účinnost a používají se výhradně transfekční DNA s malou koncentrací. Mezi hlavní výhody DEAE dextranu řadíme snadnou proveditelnost a rychlost, aplikace na širokou škálu typů buněk a levnost dané metody. Hlavní nevýhodou je vysoká koncentrace DEAE dextranu, která může být do určité míry toxická pro buňky. Provedení transfekce buněčných linií nízkomolekulární plazmidové DNA se uskutečňuje prostřednictvím polykationtů. Z polykationtů se používá např., polybren nebo poly-L-ornitin společně s dimethylsulfoxidem (DMSO). Dochází k tvorbě komplexu DNA s příslušnými polykationty a vytvořený komplex se poté dostává do buňky. Pomocí DMSO je zajišťován jejich snadnější průnik do buňky prostřednictvím permeabilizace buněčné membrány a osmotického šoku. Další a zároveň poslední biochemický transfekční postup, který zde bude představen, je realizován pomocí lipofekčních postupů. Tento typ transfekčního postupu byl právě použit pro vnesení exogenního GFP do zkoumaných biologických vzorků. Pro transfekci buněk adherujících na povrch nebo primárních buněčných linií, ale i kultur rostoucích v suspenzi, se rovněž dá tento typ použít. Tento postup je založen na přítomnosti činidel, jejichž typickým znakem je lipidový charakter. Činidla se vyznačují schopností tvořit micelární struktury, tzv. lipozomy, což jsou umělé membránové měchýřky. Jimi dochází k obklopení veškeré transfekční DNA a vytvoří se tzv. lipoplex. Následně může tento vytvořený komplex fúzovat s buněčnou membránou, v některých případech po interakci s povrchem proteoglykanů, nebo jsou do buňky transportovány nереceptorovou endocytózou, jak je patrné z **obrázku 4**.



Obrázek 4 Transfekce pomocí lipofekčních postupů; převzato z [59].

Výsledkem je vznik dvouvrstvého obráceného micelárního váčku. Endozómy v buňce různě cirkulují, během jejich zrání do lysozomů může dojít k prasknutí jejich stěny. Uvnitř obsažená DNA se uvolní z endozómů do cytoplazmy a potenciálně až k jádru. Po lipofekci většinou zůstává transfekční DNA součástí membránových složek buňky. Existují dva typy lipozomálních transfekčních činidel, lišící se vlastním elektrickým nábojem. V případě použití lipozomů s negativně nabitým nábojem musí dojít k vytvoření poměrně velkých lipozomů s vysokým obsahem vodného prostředí, což bude vhodné pro přenášenou nukleovou kyselinu. Úspěšnost této techniky není nijak výrazná, vzhledem k obtížné reprodukovatelnosti. V současnosti se mnohem více uplatňují lipidy s kladně nabitým nábojem. Jejich výhoda spočívá ve vytvoření daného komplexu spontánním způsobem na základě iontových interakcí. Hlavní výhodou je snadné použití, minimum požadovaných kroků a s použitím vysoce aktivního lipidu lze dosáhnout efektivních výsledků. Naopak, tento lipofekční postup nelze aplikovat na všechny buněčné druhy [57-59].

Mezi fyzikální transfekční postupy řadíme hlavně techniku elektroporace a mikroinjekce. Elektroporace je použitelná pro přechodnou, ale i stabilní transfekci různých bakteriálních, rostlinných a savčích buněk. Mimo jiné, nalezneme její uplatnění i při klinickém použití v léčbě rakoviny. Název elektroporace naznačuje použití krátkého pulsu s vysokým napětím k překonání bariéry buněčné membrány. Aplikace vysoké intenzity elektrického pole na buňku způsobí dočasnou destabilizaci membrány. V plazmatické membráně buněk to vyvolá

tvorbu pórů a během této doby se membrána stává vysoce propustnou pro exogenní molekuly, které jsou přítomné v okolních médiích. Transfekční DNA se přesouvá do buňčné cytoplazmy skrze vytvořené póry. Jakmile je elektrické pole vypnuto, dojde k uzavření pórů v membráně a DNA se nachází uvnitř. Elektroporace je ovlivnitelná řadou faktorů. Mezi ně lze zařadit sílu aplikovaného elektrického pole, délku elektrického pulzu, teplotu, uspořádání a koncentraci DNA a iontové složení média. Výhody této techniky jsou podobné jako u technik předchozích. Jedná se o vysokou účinnost, snadné provedení a aplikace na široký rozsah buněčných typů. Značnou nevýhodu tvoří buněčná úmrtnost, pokud bychom použili neoptimální podmínky.

Perspektivu elektroporace tvoří skutečnost, že celá řada molekul (ionty, léčiva, DNA, proteiny, oligonukleotidy) může být přímo zavedena do buněčného cytosolu *in vitro* nebo *in vivo* a také do buněk pacientů. Technologie elektroporace byla ve vývoji v posledních desetiletích, jak z hlediska vybavení, ale i propracovanosti elektroporačních parametrů (délka pulzu, velikost napětí). To otevírá dveře všem výzkumným pracovníkům a lékařům v různých oblastech [57-58, 60].

Technika, která využívá mechanického způsobu přenosu DNA do jádra buněk, se nazývá mikroinjekce. Jedná se o přímé vstřikování DNA skrz plazmatickou membránu do přenášené buňky prostřednictvím tenké jehly mikromanipulátoru. Je vhodná především pro jádra oocytů a vajíček. Mikroinjekce je technikou velmi pracnou, nákladnou a technicky náročnou. Je používána při přenosu DNA u celé řady zvířat [57-58].

Biologické tranfekční postupy se nejčastěji realizují pomocí retrovirů, neboť při transfekci se obecně využívá přirozená schopnost životního cyklu virů. Viry mají velice účinný mechanismus infekce buněk a umožňují přenos vlastního genetického materiálu přes plazmatickou membránu. Zpětnou transkripcí dochází v infikované buňce k přepisu retrovirální RNA do DNA, která se začlení do hostitelského genomu. Vzhledem k této skutečnosti se začaly vytvářet retrovirové vektory, v nichž jsou obsaženy sekvence retroviru a jsou vnořené do bakteriálního plazmidu. Studovaná DNA se pak přenáší do virových sekvencí plazmidu. Nevýhoda používání retrovirů při transfekci hraje hlavní roli v nedostatečné účinnosti infekce nedělicích se buněk. Retroviry v sobě zároveň zahrnují určité významné patogeny, které dokážou vyvolat v těle člověka, ale i jiného živočicha, určitý typ rakoviny. Proto musí být používané retroviry pro své účely upraveny tak, aby se zamezilo jejich případným nežádoucím účinkům [58].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a přístroje

3.1.1 Činidla, příprava roztoků

Fosfátový pufr skládající se z 0,02% KCl (100 %), 0,005% KH_2PO_4 (99,8 %), 0,115% NaH_2PO_4 (98 %), 0,8% NaCl (99,9 %) (Lach-Ner, Neratovice, ČR) o pH 7,4 a transfekční činidlo *nanofectamin* (čistota neuvedena, PAA: The Cell Culture Company, Pasching, Rakousko) byly použity při laboratorní přípravě vzorků (prováděno na ÚHKT).

Roztok trypsinu skládající se z 0,25% trypsinu (čistota neuvedena, Gibco, Life Technologies, Praha, ČR) a 1 mM EDTA (čistota neuvedena, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) byl použit při laboratorní přípravě vzorků (prováděno na ÚHKT).

Médium D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s 10% *fetálním sérem* (Gibco, Life Technologies, Praha, ČR) byl použit při laboratorní přípravě vzorků (prováděno na ÚHKT).

Ne-denaturační lyzační pufr skládající se z 137 mM NaCl (99,5 %), 20 mM Tris HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethan, čistota neuvedena), 10% glycerol (99 %), 1% Triton X-100 (čistota neuvedena) a 2 mM EDTA (99 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), upraveno na pH = 8 pomocí 1M NaOH (98 %, Penta, Chrudim, ČR) a *inhibitor proteáz* (Roche, Praha, ČR) byly použity při laboratorní přípravě vzorků (prováděno na ÚHKT).

ACN (CHROMASOLV, pro HPLC, $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) byl použit v různých objemových poměrech v kombinaci s deionizovanou H_2O .

MeOH (LC-MS CHROMASOLV, Fluka, Buchs, Švýcarsko) byl použit v různých objemových poměrech v kombinaci s deionizovanou H_2O .

MeOH o objemu 200 ml s přidavkem 200 μl CF_3COOH (CHROMASOLV, pro HPLC, $\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) byl použit v kombinaci s deionizovanou H_2O v objemovém poměru 70:30.

Pufr skládající se z 50mM KH_2PO_4 + *MeOH* v objemovém poměru 65:35 byl připraven odvážením 1,3609 g KH_2PO_4 (p.a, min. 99,0 %, Penta, Chrudim, ČR) na analytických vahách s následným rozpuštěním v deionizované vodě na celkový objem 250 ml v odměrné baňce (pH = 4,5). Z připraveného množství bylo odměřeno 130 ml a přidáno 70 ml 100% MeOH.

Pufr skládající se z 50mM KH₂PO₄ s přidavkem 0,1% CF₃COOH + MeOH v objemovém poměru 65:35 byl připraven odvážením 1,3609 g KH₂PO₄ na analytických vahách, k tomu přidáno 200 µl CF₃COOH a s následným rozpuštěním v deionizované vodě na celkový objem 250 ml v odměrné baňce (pH = 2,5). Z připraveného množství bylo odměřeno 130 ml a přidáno 70 ml 100% MeOH.

Fosfátový pufr o koncentraci 50 mM (pH = 6,8) + 300 mM NaCl byl připraven odvážením 4,4768 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O (p.a. min. 99,0 %, Penta, Chrudim, ČR), 1,9501 g NaH₂PO₄ · 2 H₂O (čistý, Lachema, Brno, ČR) a 4,3830 g NaCl (p.a. min. 99,9 %, Lachema, Brno, ČR) na analytických vahách s následným rozpuštěním v deionizované vodě na celkový objem 250 ml v odměrné baňce.

Fosfátový pufr o koncentraci 100 mM (pH = 6,8) + 0,025% NaN₃ byl připraven odvážením 8,9535 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 3,9003 g NaH₂PO₄ · 2 H₂O a 0,0625 g NaN₃ (purum p.a. > 99 %, Fluka, Buchs, Švýcarsko) na analytických vahách s následným rozpuštěním v deionizované vodě na celkový objem 250 ml v odměrné baňce.

Roztok myoglobinu (z koňského kosterního svalu, 95-100 %), *ovalbuminu* (albumin z kuřecího vaječného bílku, min. 98 % agarózy), *hovězího sérového albuminu (BSA, pro mikrobiální kultury)* a *fosforylasy b* (z králíčího svalu) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) o koncentraci 1 mg/ml byl připraven odvážením 0,0010 g daného proteinu na analytických vahách s následným rozpuštěním v 1 ml deionizované vody.

Octanový pufr skládající se z CH₃COONH₄ o koncentracích 3, 5, 7 mM byl připraven odvážením 0,0578 g, 0,0964 g a 0,1349 g CH₃COONH₄ (p.a., min. 98,5 %. Penta, Chrudim, ČR) na analytických vahách s následným rozpuštěním v deionizované vodě na celkový objem 250 ml v odměrné baňce.

Octanový pufr o koncentracích 3, 5, 7 mM + 20% MeOH byl připraven odvážením 0,0578 g, 0,0964 g a 0,1349 g CH₃COONH₄ na analytických vahách, k tomu přidáno 50 ml 100% MeOH a doplněno deionizovanou vodou do 250 ml odměrné baňky.

Octanový pufr o koncentracích 3, 5, 7 mM + 60% MeOH byl připraven odvážením 0,0578 g, 0,0964 g a 0,1349 g CH₃COONH₄ na analytických vahách, k tomu přidáno 150 ml 100% MeOH a doplněno deionizovanou vodou do 250 ml odměrné baňky.

Trypsin z vepřového pankreatu (lyofylizovaný, čištěný afinitní chromatografií, Merck, Darmstadt, Německo).

Roztok močoviny o koncentraci 8 mol/l a 0,4 mol/l NH_4HCO_3 byl připraven odvážením 2,4024 g močoviny (> 99,5 %, ultra pro molekulární biologii, Fluka, Buchs, Švýcarsko) a 0,1581 g NH_4HCO_3 (ultra, > 99,5 %, Fluka, Buchs, Švýcarsko) na analytických vahách a doplněn destilovanou vodou do 5 ml odměrné baňky.

Roztok D,L-dithiothreitolu (DTT) o koncentraci 45 mM byl připraven odvážením 0,0347 g DTT ($\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na analytických vahách a doplněn destilovanou vodou do 5 ml odměrné baňky.

Roztok jodacetamidu (IAA) o koncentraci 100 mM byl připraven odvážením 0,0925 g IAA ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na analytických vahách a doplněn destilovanou vodou do 5 ml odměrné baňky.

Roztok HCl o koncentraci 1 mM byl připraven odměřením 8 μl HCl (36,5-38%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) o hustotě 1,2 g/ml a doplněn destilovanou vodou na celkový objem 100 ml v odměrné baňce.

Chemikálie *aceton* (p.a., Lachema, Brno, ČR) a *CF_3COOH* (pro peptidy-syntéza, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Německo).

Směs *$\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$* s přídavkem 0,1% *$\text{HCOOH}$* byla k dispozici v laboratoři.

3.1.2 Přístrojové vybavení

A. ÚHKT

- Fluorescenční mikroskop Leica DM ILHC (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo) pro ověření úspěšnosti transfekce
- Inkubátor O_2/CO_2 , model MCO-18M (Schoeller Instruments, Praha, ČR)
- Centrifuga Universal 320R (Hettich, England)
- Zařízení Plate CHAMELEONTM V (Hidex, Turku, Finsko) pro měření aktuální fluorescence buněčných lyzátů
- Zařízení Fluorescent Image Analyzing System FLA-5100 (Fujifilm, Tokyo, Japonsko) pro měření fluorescence buněčných lyzátů v rozpouštědlech
- Box s laminárním prouděním HeraSafe 12 (Heraeus Instruments, Hanau, Německo) pro práci v sterilním prostředí
- pH-metr model Jenway 3510 (P-LAB, Praha, ČR)

B. Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie

- Zařízení HPLC (1): vysokotlaká gradientová pumpa model Beta 10, membránový vakuový odplyňovač DG 3014, UV/VIS detektor typu Safir 800 (ECOM spol. s.r.o, Praha, ČR), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 20 μ l, sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.4.04.121 (DataApex, Praha, ČR)
- Zařízení HPLC (2): vysokotlaká gradientová pumpa model Beta, membránový vakuový odplyňovač DG 3014, UV detektor typu LCD 2084, dávkovací ventil se smyčkou o objemu 10 μ l (ECOM spol. s.r.o, Praha, ČR), fluorescenční detektor 2475 (Waters, Milford, Velká Británie), sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.6.06.574 (DataApex, Praha, ČR)
- Zařízení HPLC (3): vysokotlaká gradientová pumpa model Crystal 200, membránový vakuový odplyňovač CSI 6150 (Cambridge Scientific Instruments, UK), UV/VIS detektor typu UV PU 4020 (Pye Unicam, Cambridge, UK), fluorescenční detektor FL 2000 (Spectra System, USA), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 5 μ l, sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.8.1.584 (DataApex, Praha, ČR)
- HPLC kapalinový chromatograf (Agilent Technologies, Waldbroon, Německo): 1200 Series Infinity LC (pumpa, odplyňovač, autosampler s dávkovací smyčkou nastavenou na objem 10 μ l, termostat pro autosampler, termostat pro kolonu), 1290 Infinity DAD detektor, 6460 Triple Quadrupole LC/MS, počítačový program pro zpracování výsledků Mass Hunter workstation software
- Separační kolona Lichrospher RP-Select B, rozměry: 125 cm x 4 mm s velikostí částic 5 μ m (Merck, Darmstadt, Německo)
- Separační kolona Biospher PSI 100 CN, rozměry: 150 mm x 4,6 mm s velikostí částic 5 μ m (Labio a.s., Praha, ČR)
- Separační kolona Biospher PSI 100 C18, rozměry: 150 mm x 4,6 mm s velikostí částic 5 μ m (Labio a.s., Praha, ČR)
- Separační kolona Ascentis®Express Peptide ES-C18, rozměry: 150 mm x 3 mm s velikostí částic 2,7 μ m (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Separační kolona Supelcosil™ LC-SCX, rozměry: 250 mm x 4,6 mm s velikostí částic 5 μ m (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Separační kolona Yarra 3u SEC-4000, rozměry: 300 mm x 7,8 mm s velikostí částic 3 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Separační kolona BioSep-SEC-s2000, rozměry: 300 mm x 7,8 mm s velikostí částic 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, USA)
- pH-metr model 3510 (Jenway, UK)
- Centrifuga Minispin Plus (Eppendorf, Německo)
- Digitální bloková lázeň Grant (Grant Industries, Cambridge, UK)
- Skleněná stříkačka Hamilton (Reno, Nevada, USA) o objemu 10 μl
- Program Origin 6.0 (OriginLab Corporation, USA)

C. Zentiva k.s.

- Kapalinový chromatograf: kvarterní pumpa Rheos Allergo (dříve Flux Instruments, v současnosti firma Thermo Fisher Scientific, MA, USA), autosampler HTS PAL (CTC Analytics, Švýcarsko), LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), počítačový program pro zpracování výsledků Xcalibur 2.1
- Separační kolona Kinetex C18, rozměry: 150 mm x 4,6 mm s velikostí částic 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

3.2 Laboratorní postup přípravy vzorků

Jak již bylo zmíněno v teoretickém úvodu, pro své analýzy jsem využívala tři typy biologických vzorků: negativní kontrolu (vzorek 1), samotné GFP (vzorek 2), GFP-MRCK alfa (vzorek 3). Přítomnost příslušných proteinů ve vzorcích byla dosažena transientní transfekcí pomocí lipofekčních postupů. Základním používaným transfekčním činidlem v laboratoři je nanofectamin. Nanofectamin je v podstatě lipid s polykationtovým povrchem, který váže nukleové kyseliny a tvoří s nimi stabilní lipoplexy. Celý pracovní postup přípravy vzorků trvá několik dní, záleží především na schopnosti růstu HeLa buněk. Je možné rozdělit přípravu vzorků do tří základních bodů:

1) Smíchání příslušných činidel

- HeLa buňky jsou vysety v takové koncentraci, aby v době transfekce dosáhly 90-100% konfluence

- Skladování: DNA (-20°C, krátkodoběji -4°C), nanofectamin (-20°C)
- Na 35 mm Petriho misku:
 - Roztok 1: 50 µl fosfátového pufru + 8 µl nanofectaminu
 - Roztok 2: 50 µl fosfátového pufru + 2 µg DNA
 - Smíchat opatrně roztok 1 a 2
 - Inkubace 20-30 minut při pokojové teplotě (obklopení DNA nanofectaminem a tvorba komplexu)
 - Připipetovat roztok k buňkám
 - Následná 24 hod. kultivace

Úspěšnost transfekce se ověřuje pomocí fluorescenční mikroskopie. Dále následuje příprava lyzátu z těchto buněk.

2) **Sklízení buněk**

- Odsát médium
- Opláchnout buňky fosfátovým pufrem (odstranění média)
- Ztryptinizovat malým množstvím roztoku trypsinu (uvolnění buněk)
- Přidáním média D-MEM s 10% fetálním sérem dojde k inaktivaci trypsinu

3) **Příprava lyzátu**

- Stočení kultury (1500 ot./min., 5 min.)
- 2x promýt fosfátovým pufrem (stočit po každém promytí – stejné otáčky)
- Přidat lyzační pufr a inhibitor proteáz (cca 30 min. na ledu, občas promíchat na vortexu)
- Stočení (14000 ot./min., 20 min., 4°C)
- Odsátí supernatantu a jeho následné zmrazení

3.2.1 Fluorescence buněčných lyzátů

Svítivost připravených buněčných lyzátů se na ÚHKT proměřuje prostřednictvím přístroje Plate CHAMELEONTM V. Tento typ zařízení dokáže měřit kromě již zmíněné fluorescence ještě luminiscenci, chemoluminiscenci nebo radioaktivitu. **Tabulka 1** představuje změřené hodnoty fluorescence připravených buněčných lyzátů v určitém časovém úseku.

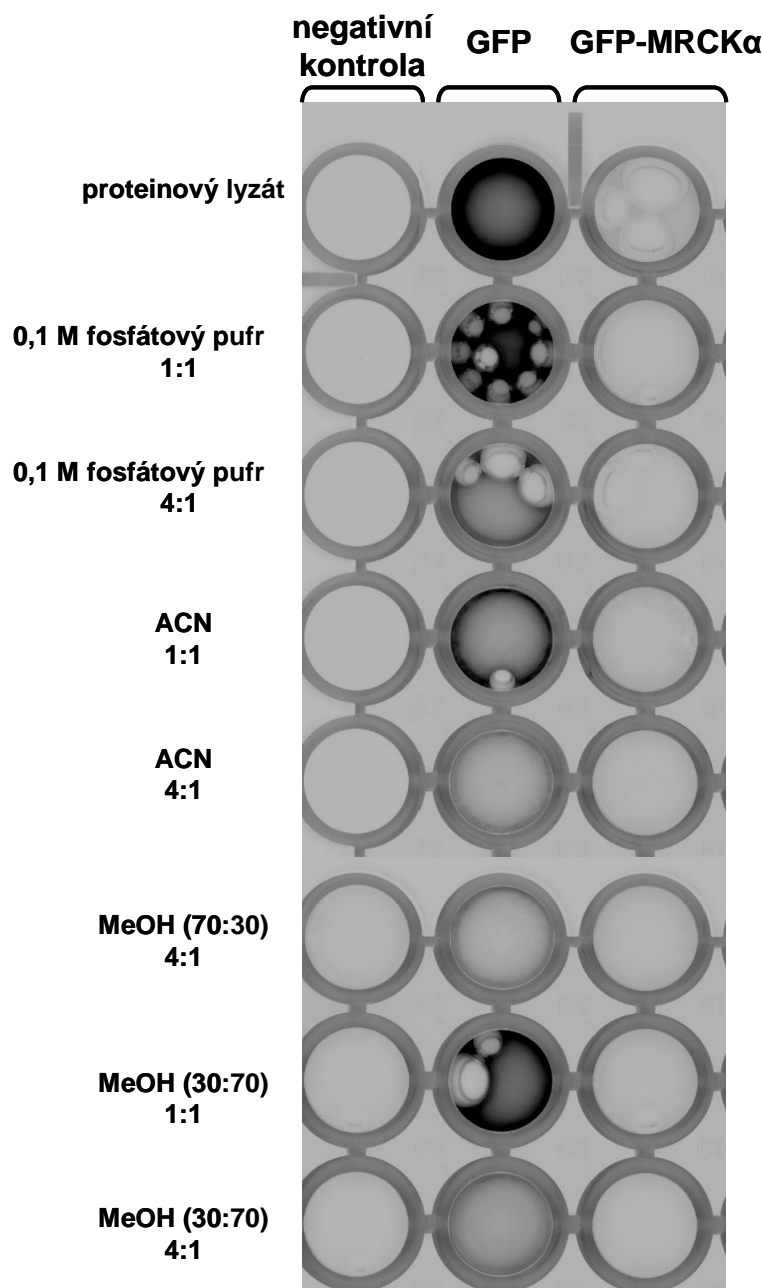
Tabulka 1 Naměřené hodnoty fluorescence buněčných lyzátů.

Fluorescence buněčných lyzátů	Datum: 11.4. 2013	Datum: 19.4. 2013
Vzorek 2 (GFP)	10441	8138
Vzorek 3 (GFP-MRCK alfa)	1793	1426

Z **tabulky 1** je možné pozorovat klesající fluorescenci obou buněčných lyzátů s časovým odstupem jednoho týdne. Jedná se o relativní hodnoty fluorescence po odečtení blanku.

3.2.2 Vliv rozpouštědel na fluorescenci buněčných lyzátů

V této práci byl také zjišťován vliv rozpouštědel na přirozenou fluorescenci jednotlivých vzorků. Měření fluorescence daných vzorků v jednotlivých typech rozpouštědel bylo prováděno pomocí zařízení Fluorescent Image Analyzing System FLA-5100. Zmíněný typ zařízení rovněž umožňuje zjištění hodnoty fluorescence, luminiscence, chemoluminiscence či radioaktivity různých biologických vzorků. Jednotlivá měření se realizují v mikrotitračních destičkách. Zařízení obsahuje 3 lasery s rozdílnými vlnovými délkami excitačního a emisního záření. Z excitačních vlnových délek je možné si nastavit hodnoty na 473, 532 nebo 635 nm. Hodnoty emisního záření jsou 510, 575 nebo 665 nm. Pro má měření byla zvolena excitační vlnová délka 473 nm a emisní vlnová délka 510 nm, neboť se nejvíce přibližuje známým hodnotám maxima pro excitační a emisní vlnovou délku GFP. Fluorescence vzorků byla testována v 0,1 M fosfátovém pufru a dále byly vyzkoušeny různé poměry ACN a MeOH v kombinaci s deionizovanou vodou. **Obrázek 5** znázorňuje svítivost jednotlivých vzorků rozpuštěných v těchto typech rozpouštědel.



Obrázek 5 Fluorescence vzorků v jednotlivých typech rozpouštědel [vlastní zpracování].

Z **obrázku 5** je tedy patrné, že tato rozpouštědla mají částečný vliv na přirozenou fluorescence vzorků. GFP ve většině těchto rozpouštědel vykazuje fluorescence, avšak ředěním se fluorescence vzorku výrazně snižuje. Snižování fluorescence u GFP-MRCK alfa je dáno daleko nižší koncentrací tohoto proteinu ve vzorku než u GFP. Jednotlivé vzorky byly porovnávány vůči negativní kontrole, což je proteinový HeLa lyzát bez fluorescenčního proteinu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní stacionární fázi, na polární stacionární fázi, na iontovém měniči a na silikagelu s různou velikostí pórů kombinovaná se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti, fluorescenční detekcí a hmotnostní spektrometrií byla použita k charakterizaci studovaných vzorků a měření rozdílů v jejich složení.

4.1 Charakterizace vzorků

Řešení tohoto úkolu bylo zkomplikováno některými níže popsanými faktory. Biologické vzorky, se kterými jsem pracovala, byly pokaždé připravovány stejným způsobem, avšak jejich výsledná fluorescence byla vždy různá. Byla také zaznamenána klesající fluorescence vzorků při jejich dlouhodobém skladování a používání, jedná se tedy o vysoce variabilní materiál. Celkově se lišila i jejich koncentrace, co se týče množství buněk. Po celou dobu plnění výše uvedeného zadání nebyly k dispozici příslušné standardy těchto látek, pouze připravené buněčné lyzáty. Z těchto důvodů byl zvolen takový postup, který vychází od použití nejjednodušších postupů až po metody vysoce specifické a náročné na přístrojové vybavení. Zároveň byly experimenty prováděny na třech různých typech přístrojů HPLC za současného použití UV i fluorescenční detekce. Větší část této práce proto byla soustředěna na charakterizaci vzorků tzn. nalezení takové kolony, která by byla nejvhodnější pro jejich separaci, optimalizaci složení mobilní fáze tak, abychom ve výsledném chromatogramu dosáhli přítomnosti píků v různých retenčních časech. Na základě dosažené informace lze dále pomocí hmotnostní spektrometrie odvodit strukturu nalezené potenciální látky, která by mohla odpovídat právě GFP či MRCK alfa.

4.1.1 KOLONA: Lichrospher RP-Select B (5 μ m, 125 cm x 4 mm)

Pro mé počáteční analýzy byla zvolena kolona Lichrospher s reverzní stacionární fází. Reverzní fáze HPLC je široce používána pro analýzy peptidů a vzorků obsahujících proteiny, jak již bylo řečeno v teoretické části. Jejich UV detekce se obvykle provádí při vlnové délce 210 až 220 nm nebo vyjíměčně při 280 nm [26]. Pro první experimenty byl použit právě tento způsob detekce a jednotlivé parametry nastavení jsou znázorněny v **tabulce 2**.

Tabulka 2 Podmínky separace na koloně Lichrospher RP-Select B.

Zařízení HPLC (1): vysokotlaká gradientová pumpa Beta 10, membránový vakuový odplyňovač DG 3014, UV/VIS detektor typu Safir 800 (ECOM spol. s r.o, Praha, ČR), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 20 µl, sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.4.04.121 (DataApex, Praha, ČR)

Podmínky měření

Průtok mobilní fáze: 0,3 ml/min

Vlnová délka UV detektoru: 220 nm

Teplota kolony: za laboratorních podmínek

Mobilní fáze	Tlak na koloně (Bar)
70% MeOH + 30% H ₂ O	115-120
70% ACN + 30% H ₂ O	90

Bylo nutné vzorky zředit 10x pomocí deionizované vody, neboť při jejich prvním nástřiku bylo zjištěno, že jsou příliš koncentrované. Při použití 70% MeOH + 30% H₂O se na výsledných chromatogramech jednotlivých vzorků objevil jeden pík s retenčním časem kolem 8. minuty. Podobného výsledku bylo dosaženo i v případě mobilní fáze 70% ACN + 30% H₂O. Záznamy všech aplikovaných vzorků opět obsahovaly jediný pík s retenčním časem okolo 7. minuty.

Testovaná kolona není vhodná pro separaci hledaných proteinů, pomocí ní a použitých mobilních fází nebylo dosaženo žádných cenných poznatků pro její případné zlepšení. Zároveň se konečné výsledky jednotlivých vzorků od sebe výrazně nelišily při použití již zmíněných mobilních fází. Na základě získaných informací lze říci, že ACN se jevil jako lepší volba použití mobilní fáze z hlediska velikosti tlaků, které nepřesáhly hodnotu 100 barů, jak je vidět z **tabulky 2**.

4.1.2 KOLONA: Biospher PSI 100 CN (5 µm, 150 x 4,6 mm)

Další volbou se stala kolona Biospher na bázi kyanidů jako stacionární fáze. Kolona byla testována na dvou zařízeních pro HPLC. Podmínky měření na prvním typu HPLC zůstaly zachovány, pouze byl nepatrně zvýšen průtok mobilní fáze, jak je patrné z **tabulky 3** a v této analýze byl použit pouze UV detektor. Následné testování stejné kolony na druhém typu HPLC bylo provedeno rozdílným UV detekčním zařízením a rovněž pomocí fluorescenčního detektoru při stejných parametrech měření a podmínky této separace představuje **tabulka 4**.

Tabulka 3 Podmínky separace na koloně Biospher PSI 100 CN.

Zařízení HPLC (1): vysokotlaká gradientová pumpa Beta 10, membránový vakuový odplyňovač DG 3014, UV/VIS detektor typu Sařir 800 (ECOM spol. s r.o, Praha, ČR), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 20 µl, sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.4.04.121 (DataApex, Praha, ČR)

Podmínky měření

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Vlnová délka UV detektoru: 220 nm

Teplota kolony: za laboratorních podmínek

Mobilní fáze	Tlak na koloně (Bar)
70% MeOH + 30% H ₂ O	8-10
70% ACN + 30% H ₂ O	8-10
30% MeOH + 70% H ₂ O	18-20
30% ACN + 70% H ₂ O	5

Použitím mobilní fáze, která byla tvořena 70% organické části a 30% části vodné, byly také získány stejné chromatogramy pro všechny tři rozdílné vzorky bez ohledu na typ použitého organického modifikátoru - ACN či MeOH. V záznamu se nacházela pouze směs nerozlišitelných píků do 5. minuty analýzy, což by s největší pravděpodobností mohlo

odpovídat mrtvému retenčnímu času. V příslušných měřeních bylo pracováno se vzorky, které byly 10x zředěny deionizovanou vodou. Aplikací mobilní fáze 30% MeOH + 70% H₂O jsou záznamy všech neřaděných vzorků téměř shodné. Je zaznamenán jejich stejný profil probíhající analýzy, ale retenční čas jediného přítomného píku se od sebe v jednotlivých vzorcích nepatrně liší. Vzorek negativní kontroly a vzorek obsahující GFP-MRCK mají tento pík v retenčním čase okolo 30. minuty analýzy, kdežto u vzorku obsahující pouze GFP se pík objevuje o pět minut dříve. I zde je přítomna směs nerozlišitelných píků v prvních minutách analýzy. Obdobných výsledků bylo dosaženo i při mobilní fázi 30% ACN + 70% H₂O. V chromatogramech 10x řaděných vzorků bylo možné pozorovat pouze jeden pík v retenčním čase kolem 15. minuty.

Na základě naměřených výsledků lze usoudit, že menší procento organické složky má jednoznačně lepší vliv na separaci při použití kyano-propylové kolony, neboť ve výsledných chromatogramech byl přítomen jeden pík, i přes přibližně stejné hodnoty retenčních časů jednotlivých buněčných lyzátů. Použitá kolona a mobilní fáze nejsou pro danou separaci vhodným řešením.

Tabulka 4 Podmínky separace na koloně Biospher PSI 100 CN.

Zařízení HPLC (2): vysokotlaká gradientová pumpa model Beta, membránový vakuový odplyňovač DG 3014, UV detektor typu LCD 2084, dávkovací ventil se smyčkou o objemu 10 µl (ECOM spol. s r.o, Praha, ČR), fluorescenční detektor 2475 (Waters, Milford, MA, USA), sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.6.06.574 (DataApex, Praha, ČR)

Podmínky měření

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Vlnová délka UV detektoru: 220 nm

Fluorescenční detektor: $\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{emis.} = 507 \text{ nm}$

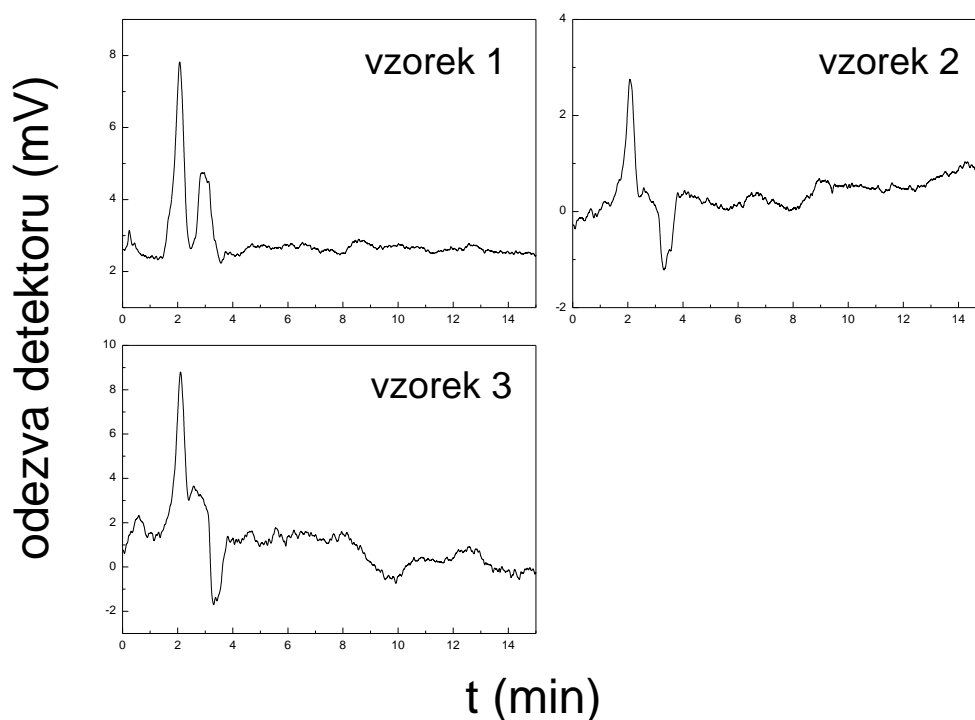
Teplota kolony: za laboratorních podmínek

Mobilní fáze	Tlak na koloně (Bar)
30% ACN + 70% H ₂ O	45-50
70% ACN + 30% H ₂ O	30-35

Důvod výběru mobilní fáze spočíval v nižších hodnotách velikosti tlaku na koloně ve srovnání s MeOH. K měření byly rovněž použity 10x ředěné vzorky deionizovanou vodou. Po jejich nadávkování do separačního systému, kterým protékal 30% ACN + 70% H₂O a následným snímáním UV detektorem jsem obdržela totožné chromatogramy. V nich se vyskytl pík s retenčním časem kolem 16. minuty. Do 5. minuty analýzy byl přítomen další pík, který by opět mohl odpovídat mrtvému retenčnímu času. Při použití mobilní fáze s obráceným poměrem, tedy 70% ACN + 30% H₂O, se pomocí UV detekce na výsledných chromatogramech zředěných vzorků objevila směs píků na počátku analýzy. Z testování stejné kolony na dvou zařízeních HPLC za současného zachování jednotlivých parametrů byla naměřena téměř shodná data pro každý vzorek, nepatrný rozdíl je v retenčním čase jediného přítomného píku.

Úvodem této kapitoly bylo již zmíněno první použití fluorescenčního detektoru při protékající mobilní fází 70% ACN + 30% H₂O. Chromatogramy by měly mít přítomný signál

pro vzorek 2, obsahující pouze GFP a vzorek 3, kde GFP je navázaný na MRCK alfa. **Obrázek 6** znázorňuje chromatogram každého vzorku za použití fluorescenční detekce.



Obrázek 6 Naměřené chromatogramy jednotlivých vzorků pomocí fluorescenčního detektoru. Mobilní fáze 70% ACN + 30% H₂O, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, kolona Biospher PSI 100 CN (150 x 4,6 mm, 5 μm).

Vzorky 2 a 3 se svým obsahem od sebe liší, a přesto je možné z chromatogramu na **obrázku 6** si všimnout jejich shodného výsledku. Velikosti získaného signálu jsou od sebe rozdílné. Obsah vzorku negativní kontroly tvoří pouze MRCK alfa, tudíž na jeho záznamu by neměla být přítomna žádná odezva. Přesto byl nějaký signál zaznamenán, může se však jednat o fluoreskující nečistoty. Použité prostředky nejsou opět tím správným řešením pro cestu k úspěchu dané separace proteinů.

4.1.3 KOLONA: Biospher PSI 100 C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm)

K získání dalších poznatků o přítomnosti hledaných látek v buněčných lyzátech byla v následujících analýzách použita klasická kolona C18. Jednotlivá měření byla prováděna stále za stejných podmínek, ale na jiném typu zařízení HPLC než bylo doposud uváděno, včetně jiného UV a fluorescenčního detektoru.

Tabulka 5 Podmínky separace na koloně Biospher PSI 100 C18.

Zařízení HPLC (3): vysokotlaká gradientová pumpa model Crystal 200, membránový vakuový odplyňovač CSI 6150 (Cambridge Scientific Instruments, UK), UV/VIS detektor typu UV PU 4020 (Pye Unicam, Cambridge, UK), fluorescenční detektor FL 2000 (Spectra System, USA), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 5 µl, sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.8.1.584 (DataApex, Praha, ČR)

Podmínky měření

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Vlnová délka UV detektoru: 220 nm

Fluorescenční detektor: $\lambda_{exc.} = 488$ nm, $\lambda_{emis.} = 507$ nm

Teplota kolony: za laboratorních podmínek

Mobilní fáze	Tlak na koloně (Bar)
70% ACN + 30% H ₂ O	28-30
30% ACN + 70% H ₂ O	45-50
70% MeOH + 30% H ₂ O	57-68
30% MeOH + 70% H ₂ O	68

Při průtoku mobilní fáze 70% ACN + 30% H₂O kolonou za současné UV/VIS a fluorescenční detekce bylo dosaženo stejných výsledků měření pro všechny tři neřaděné vzorky. Zároveň byl proveden nástřik ne-denaturačního lyzačního pufru, který se používá při přípravě vzorků a měla jsem jej v danou chvíli k dispozici. Na jejich záznamech získané pomocí UV/VIS detekce je možné pozorovat 2 píky v retenčních časech kolem 3. a 10.

minuty. Z toho vyplývá, že výsledky měření jednotlivých vzorků odpovídají pouze obsahu lyzačního pufru. Při použití 30% ACN + 70% H₂O byl na chromatogramech každého změřeného vzorku pomocí UV/VIS detektoru přítomen pouze jeden pík v čase 3 minuty. Aplikací mobilní fáze směsi MeOH a deionizované H₂O v obou poměrech byl zaznamenán shodný výsledek jako u 30% ACN + 70% H₂O. Jednotlivé záznamy získané z fluorescenčního detektoru obsahovaly po celou dobu měření pouze šum. Vzhledem k dosaženým výsledkům u MeOH byla posléze vyzkoušena ještě mobilní fáze 70% MeOH + 30% H₂O s přidavkem trifluoroctové kyseliny. Cílem bylo podpoření protonizace a dosáhnout tak lepší výsledné separace, avšak tímto přidavkem se ve výsledcích nic nezměnilo.

Použitý typ fluorescenčního detektoru není dostatečně citlivý, neboť jsme ve všech provedených analýzách pozorovali pouze šum. Zvolená kolona a mobilní fáze se nepotvrdily jako vhodným řešením pro nalezení přítomných proteinů ve vzorcích, jejich měření byly získány stejné záznamy.

4.1.4 KOLONA: Ascentis®Express Peptide ES-C18 (2,7 µm, 150 x 3 mm)

Kolony Ascentis Express byly vyvíjeny za účelem rychlé a vysoce účinné separace a jejich využití lze uplatnit v systémech LC-MS, ale i v klasických HPLC uspořádáních. Tento typ kolony v současné době vytváří novinku na trhu firmy Supelco a je realizovaná přímo na separaci peptidů a malých proteinů. Sloupec je založen na novém taveném jádře částic. Fused-core částice poskytují tenkou porézní skořápku vysoce čistého křemíku kolem pevného křemene jádra [61]. Její použití by se zdálo být vhodným řešením daného problému, ale při dávkování vzorků do separačního systému se projevoval příliš vysoký tlak, který byl nad rámec nastavení u používané pumpy. Nejspíše hned na samém počátku došlo k přiučpání kolony vzorky bílkovin a nebylo tak následně možné dokončit jejich analýzy. Proto jako další postup byla zvolena iontově výměnná chromatografie.

4.1.5 KOLONA: Supelcosil™ LC-SCX (5 µm, 250 x 4,6 mm)

Tento typ chromatografie je výhodný pro analýzy peptidů nebo proteinových směsí, protože poskytuje rozdílné základy retence a odlišnou selektivitu ve srovnání s chromatografií

na reverzní fázi. Schopnost iontové výměnné chromatografie spočívá v ochraně nativní konformace proteinů a zároveň udržuje jejich aktivitu [26].

Tabulka 6 Podmínky separace na koloně Supelcosil™ LC-SCX.

Zařízení HPLC (3): vysokotlaká gradientová pumpa model Crystal 200, membránový vakuový odplyňovač CSI 6150 (Cambridge Scientific Instruments, UK), UV/VIS detektor typu UV PU 4020 (Pye Unicam, Cambridge, UK), fluorescenční detektor FL 2000 (Spectra System, USA), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 5 μ l, sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.8.1.584 (DataApex, Praha, ČR)

Podmínky měření

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Vlnová délka UV detektoru: 254 nm

Fluorescenční detektor: $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emis.}} = 507 \text{ nm}$

Teplota kolony: za laboratorních podmínek

Mobilní fáze	Tlak na koloně (Bar)
50mM pufr KH_2PO_4 + MeOH v poměru 65:35 (pH = 4,5)	50
50mM pufr KH_2PO_4 s přidavkem 0,1 % CF_3COOH + MeOH v poměru 65:35 (pH = 2,65)	50

Při použití 50mM pufru KH_2PO_4 + MeOH v objemovém poměru 65:35 jako mobilní fáze bylo dosaženo stejných výsledků pro vzorek 1 a vzorek 3. Na záznamu z UV/VIS detektoru bylo možné pozorovat jeden pík, jehož retenční čas byl 5 minut. Na chromatogramu vzorku 2 byl přítomen stejný pík, ale navíc se za ním nacházel další menších rozměrů. Poté byla vyzkoušena stejná mobilní fáze s přidavkem 0,1% CF_3COOH za účelem více snížit pH, aby docházelo k lepšímu nabití bílkovin. I přes danou úpravu pufru bylo dosaženo obdobných výsledků pro všechny tři vzorky, tedy přítomnost jediného píku v 5. minutě analýzy. Na záznamech z fluorescenčního detektoru byl pozorován šum v celém průběhu měření.

Použitá kolona neposkytla rozdílné výsledky pro jednotlivé vzorky, proto v další části této práce byla zvolena taková, která své dělení využívá na principu gelové permeační chromatografie.

4.1.6 KOLONA: Yarra 3u SEC-4000 (3 μm , 300 x 7,80 mm)

Yarra kolony jsou plněny ultra čistým oxidem křemičitým s velikostí částic 3 μm . Jsou nabízeny ve třech provedeních lišících se velikostí pórů. Jsou ideální pro separace malých, ale i velkých proteinů. Tento konkrétní typ kolony je vhodný pro separace velkých molekul bílkovin či monoklonálních protilátek, proto byla zvolena v dalším postupu práce [62].

Tabulka 7 Podmínky separace na koloně Yarra 3u SEC-4000.

Zařízení HPLC (3): vysokotlaká gradientová pumpa model Crystal 200, membránový vakuový odplyňovač CSI 6150 (Cambridge Scientific Instruments, UK), UV/VIS detektor typu UV PU 4020 (Pye Unicam, Cambridge, UK), fluorescenční detektor 2475 (Waters, Milford, MA, USA), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 5 μl , sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.8.1.584 (DataApex, Praha, ČR)

Podmínky měření

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Vlnová délka UV detektoru: 220 nm

Fluorescenční detektor: $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emis.}} = 507 \text{ nm}$

Teplota kolony: za laboratorních podmínek

Mobilní fáze	Tlak na koloně (Bar)
50 mM fosfátový pufr (pH = 6,8) + 300 mM NaCl	20
100 mM fosfátový pufr (pH = 6,8) + 0,025% NaN ₃	22

V těchto analýzách byly zvoleny takové mobilní fáze, které sloužily jako testovací základ pro příslušnou kolonu. Při použití 50 mM fosfátového pufru + 300 mM NaCl se na záznamech z UV detektoru pro jednotlivé vzorky neobjevily samostatné píky, ale pouze jejich

nedotvořené směsi. Chromatogram z fluorescenčního detektoru pro vzorek 1 obsahoval pík s retenčním časem 10,80 min. U vzorků 2 a 3 bylo možné pozorovat dva píky s retenčními časy 10,80 a 21,70 min. Mezi těmito vzorky byl viditelný rozdíl ve výškách přítomných píků.

Naprosto totožných výsledků bylo dosaženo i při použití 100 mM fosfátového pufru + 0,025% NaN_3 pomocí fluorescenčního detektoru. Záznamy z UV detektoru vykazovaly po celou dobu analýzy šum. Vzhledem k dosaženým výsledkům lze říci, že na danou separaci proteinů nemá vliv použitá mobilní fáze.

4.1.6.1 Odhad molekulové hmotnosti vzorků

Na této koloně byla dále zjišťována přibližná molekulová hmotnost neznámých vzorků v získaných retenčních časech při průtoku 50 mM fosfátového pufru + 300 mM NaCl. Předpokladem je, že píky pozorovatelné na záznamech z fluorescenčního detektoru jednotlivých vzorků jsou látky v nich obsažené, tj. že se tedy nejedná o případné nečistoty. Jako standardy byly zvoleny bílkoviny myoglobin, ovalbumin, BSA a fosforylasa, jejichž výsledná koncentrace je 1 mg/ml. Standardní bílkoviny byly rovněž proměřeny na této koloně za stejných podmínek jako příslušné vzorky. Hodnoty molekulových hmotností a průměrné hodnoty naměřených retenčních časů pro standardní bílkoviny byly získány prostřednictvím UV detekce a jsou znázorněny v **tabulce 8**.

Tabulka 8 Naměřené hodnoty retenčních časů standardních bílkovin a jejich molekulové hmotnosti.

Standardní bílkoviny	Retenční čas [min.]	Molekulová hmotnost [Da]
Myoglobin	22,18	17 800
Ovalbumin	21,12	45 000
BSA	20,49	66 430
Fosforylasa b	19,36	97 200

Na základě změřených hodnot standardních bílkovin byla zkonstruována jejich kalibrační závislost molekulové hmotnosti na retenčním čase. Rovnice přímky pro tuto závislost má tvar:

$$M_r = 647800 - 28400 \cdot \text{retenční čas},$$

který odpovídá proloženému úseku, kde závislost M_r jednotlivých standardních bílkovin na jejich retenčních časech je lineární. Korelační koeficient r nabývá hodnoty 0,9979. Dosazením získaných dvou retenčních časů jednotlivých vzorků do příslušné rovnice přímky jsem zjistila, že potenciální látky mají molekulovou hmotnost 340 700 Da a 30 090 Da. Látka mající nižší molekulovou hmotnost by mohla odpovídat GFP, neboť se její hodnotě velmi přibližuje.

4.1.7 KOLONA: BioSep-SEC-s2000 (5 μm , 300 x 7,80 mm)

Další typ kolony, která byla vyzkoušena pro separaci vzorků je standardně používaná pro molekuly s malou molekulovou hmotností. Ta může být běžně využita k analýze a charakterizaci malých proteinů, peptidů, protilátek nebo proteinových komplexů [63].

Tabulka 9 Podmínky separace na koloně BioSep-SEC-s2000.

Zařízení HPLC (3): vysokotlaká gradientová pumpa model Crystal 200, membránový vakuový odplyňovač CSI 6150 (Cambridge Scientific Instruments, UK), UV/VIS detektor typu UV PU 4020 (Pye Unicam, Cambridge, UK), fluorescenční detektor 2475 (Waters, Milford, MA, USA), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 5 μl , sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.8.1.584 (DataApex, Praha, ČR)

Podmínky měření

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Vlnová délka UV detektoru: 220 nm

Fluorescenční detektor: $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emis.}} = 507 \text{ nm}$

Teplota kolony: za laboratorních podmínek

Mobilní fáze	Tlak na koloně (Bar)
5 mM octanový pufr	16

Měření prováděna na této koloně byla realizována použitím 5 mM octanového pufru jako mobilní fáze. Výsledky získané pomocí UV detektoru byly shodné pro všechny tři vzorky a nevykazovaly charakter nějakého píku. Pomocí fluorescenční detekce nebyl pozorován žádný pík na záznamu vzorku 1, chromatogram vzorku 2 poskytl jeden pík v retenčním čase 17. minuty a pík u vzorku 3 eluoval přibližně o dvě minuty dříve.

4.2 Hmotnostní spektrometrie

Vzhledem k dosaženým výsledkům, které byly získány různými metodami, začínající od chromatografie na reverzní fázi až po gelovou permeační chromatografii, za použití různých kolon, mobilních fází a snímání prostřednictvím dvou detektorů, se nepodařilo nalézt přítomnost proteinů v připravovaných vzorcích, neboť při každé provedené analýze byly získány totožné výsledky pro všechny tři rozdílné vzorky. Proto v následujícím kroku této práce jsem přistoupila k měření na hmotnostním spektrometru, který by do určité míry dokázal poodhalit skutečný obsah buněčných lyzátů. MS patří k citlivějším detekčním metodám a vyžaduje použití těkavých pufrů. Nejprve bylo ale zapotřebí provést optimalizaci podmínek pro měření.

4.2.1 Optimalizace podmínek pro MS

Optimalizace byla prováděna pomocí standardních bílkovin, tedy pomocí myoglobinu, ovalbuminu, BSA a jejich připravené směsi. Výsledná koncentrace jednotlivých bílkovin byla 1 mg/ml. K jejich měření byla zvolena kolona BioSep-SEC-s2000 (5 μ m, 300 x 7,80 mm). Jednotlivé parametry měření byly zachovány a jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 10 Nastavené parametry měření na koloně BioSep-SEC-s2000 pro optimalizaci podmínek MS.

Zařízení HPLC (3): vysokotlaká gradientová pumpa model Crystal 200, membránový vakuový odplyňovač CSI 6150 (Cambridge Scientific Instruments, UK), UV/VIS detektor typu UV PU 4020 (Pye Unicam, Cambridge, UK), fluorescenční detektor 2475 (Waters, Milford, MA, USA), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 5 μ l, sběr dat zajišťován programem Clarity verze 2.8.1.584 (DataApex, Praha, ČR)

Podmínky měření

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Vlnová délka UV detektoru: 220 nm

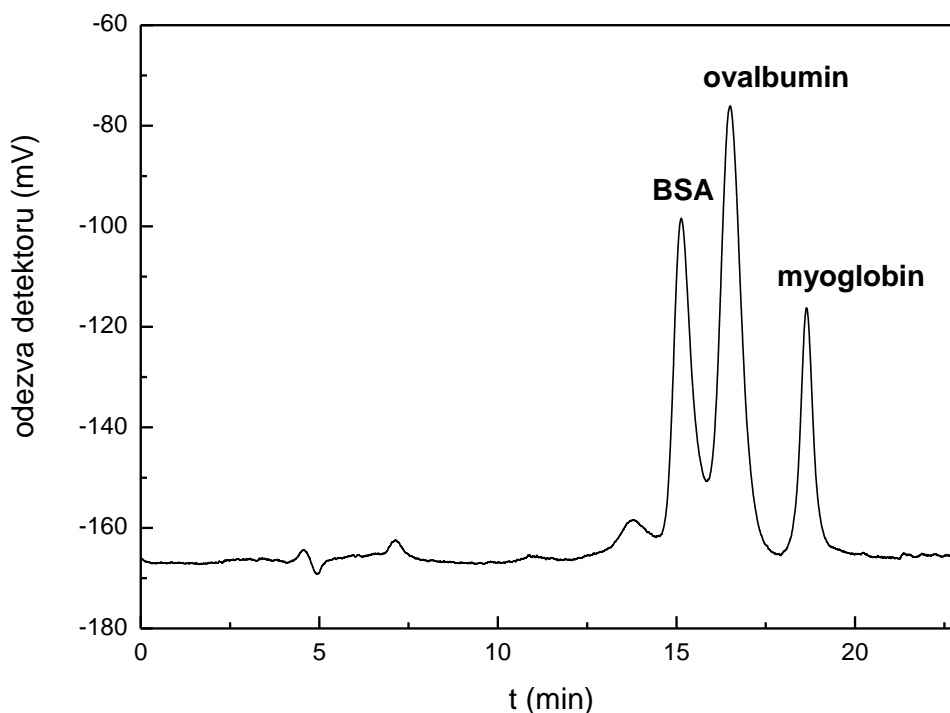
Fluorescenční detektor: $\lambda_{exc.} = 488$ nm, $\lambda_{emis.} = 507$ nm

Teplota kolony: za laboratorních podmínek

Mobilní fáze	Tlak na koloně (Bar)
3 mM octanový pufr + 20% MeOH	32-34
3 mM octanový pufr + 60% MeOH	35-38
5 mM octanový pufr + 20% MeOH	30
5 mM octanový pufr + 60% MeOH	36-38
7 mM octanový pufr + 20% MeOH	31
7 mM octanový pufr + 60% MeOH	30-35

Ke snímání byl použit pouze UV detektor. Hlavním úkolem této optimalizace bylo navrhnout, připravit a otestovat různě koncentrovaný octanový pufr s přídavkem MeOH na standardních bílkovinách tak, aby při analýze jejich směsi byly ve výsledném chromatogramu pozorovány viditelné a rozpoznatelné píky odpovídající jednotlivým druhům těchto bílkovin. Vzhledem k omezené iontové síle, která je dovolena použít na hmotnostním spektrometru, byly proto zvoleny koncentrace 3, 5 a 7 mM octanového pufru s 20% nebo 60% MeOH. Analýzy směsi standardních bílkovin za použití všech uvedených koncentrací octanového pufru s vyšším obsahem MeOH neobsahovaly ve svých záznamech žádné píky odpovídající

jednotlivým bílkovinám. Proto byl jako nejlepší volba použité mobilní fáze zvolen 5 mM octanový pufr s 20% MeOH. Výsledek jeho použití je zobrazen na záznamu analyzované směsi bílkovin, který je znázorněn na **obrázku 7**.



Obrázek 7 Analýza směsi standardních bílkovin pomocí UV detektoru. Mobilní fáze 5 mM octanový pufr + 20% MeOH, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, kolona BioSep-SEC-s2000 (300 x 7,80 mm, 5 μ m).

4.2.2 Výsledky měření z HPLC

Před zahájením měření na MS jsem nejdříve zkoušela své tři vzorky proměřit na HPLC. Kolona i jednotlivé parametry nastavení zůstaly zachovány, snímání probíhalo při současném použití UV i fluorescenčního detektoru a celým separačním systémem protékal 5 mM octanový pufr + 20% MeOH jako mobilní fáze. Zároveň jsem zde proměřovala vzorky, které byly staršího data a vzorky nově připravené. Jednotlivé analýzy různě starých vorků jsem posléze mezi sebou porovnávala. Všechny vzorky byly proměřeny několikrát s časovou prodlevou několika dní. Hlavní pozornost byla soustředěna na výsledky získané pomocí

fluorescenčního detektoru. Výsledné chromatogramy všech starších vzorků se neshodovaly s měřeními, které byly uskutečněny v následujících dnech. Zároveň výsledky provedené na nových a starších vzorcích se od sebe odlišovaly. Vyjimku tvořil pouze vzorek 2, kde byl zaznamenán stejný výsledek bez ohledu na stáří vzorku. Při měření nových vzorků byla zaznamenána jejich shoda i přes jistou časovou prodlevu. Na chromatogramu vzorku 1 byl přítomen pík kolem 11. minuty. Na získaném záznamu vzorku 2 bylo možné si všimnout také jednoho píku v 18. minutě. Vzorek 3 obsahoval tři nedotvořené píky v retenčních časech 11., 18. a 22. minutě.

4.2.3 Výsledky měření z MS

Pomocí MS bylo snahou odhalit strukturu látek přítomných ve vzorcích. Kromě měření vzorků byla také provedena analýza samotné mobilní fáze. K měření byla použita stejná kolona, tedy BioSep-SEC-s2000 a mobilní fáze 5 mM octanový pufr + 20% MeOH, která byla vybrána v rámci optimalizace podmínek. Parametry nastavení jsou zobrazeny v **tabulce 11** a výsledky měření jednotlivých vzorků jsou znázorněny na **obrázcích 8 až 10**.

Tabulka 11 Podmínky separace na koloně BioSep-SEC-s2000.

HPLC kapalinový chromatograf (Agilent Technologies, Waldbroon, Německo): 1200 Series Infinity LC (pumpa, odplyňovač, autosampler s dávkovací smyčkou nastavenou na objem 10 µl, termostat pro autosampler, termostat pro kolonu), 1290 Infinity DAD detektor, 6460 Triple Quadrupole LC/MS, počítačový program pro zpracování výsledků Mass Hunter workstation software.

Podmínky měření

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Teplota kolony: za laboratorních podmínek

Dávkovaný objem: 10 µl

Typ skenu: MS2 SCAN

Rozsah snímání hmot: 100 – 3000 m/z

Scan Time (doba skenování): 500

Fragmentor (velikost napětí na kapiláře): 50 V (vzorek 1), 250 V (vzorek 2), 135 V (vzorek 3)

Polarita: pozitivní i negativní mód

Teplota sušícího plynu: 350 °C

Průtok sušícího plynu: 12 l/min.

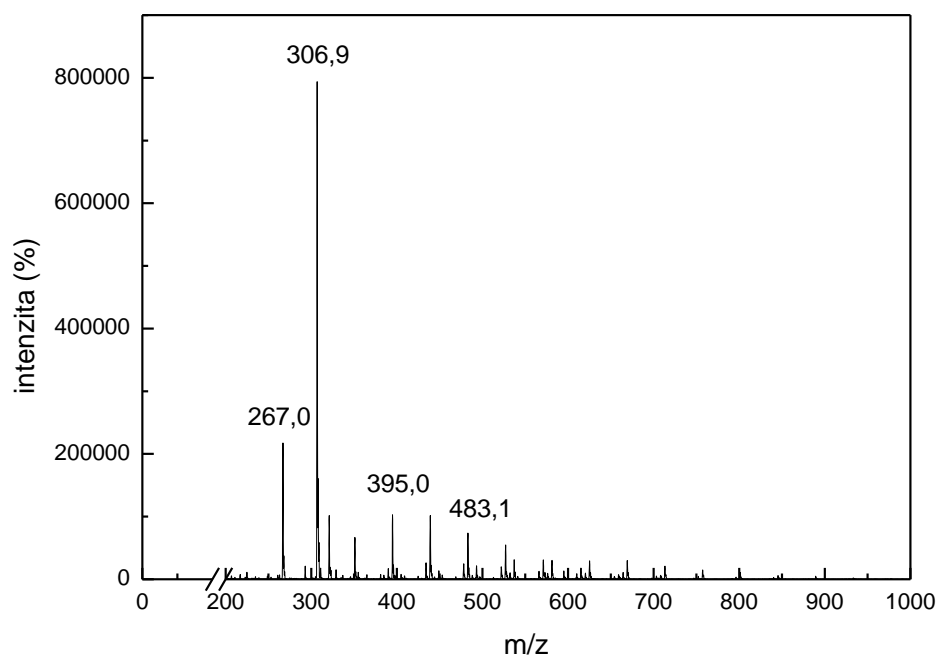
Nebulizer: 60 psi

Mobilní fáze

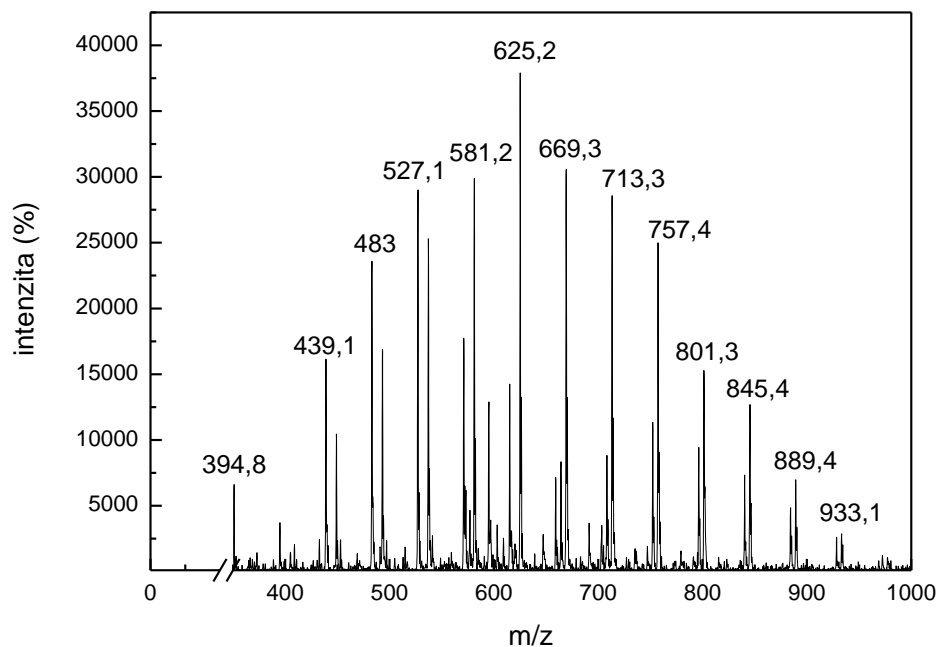
Tlak na koloně (Bar)

5 mM octanový pufr + 20% MeOH

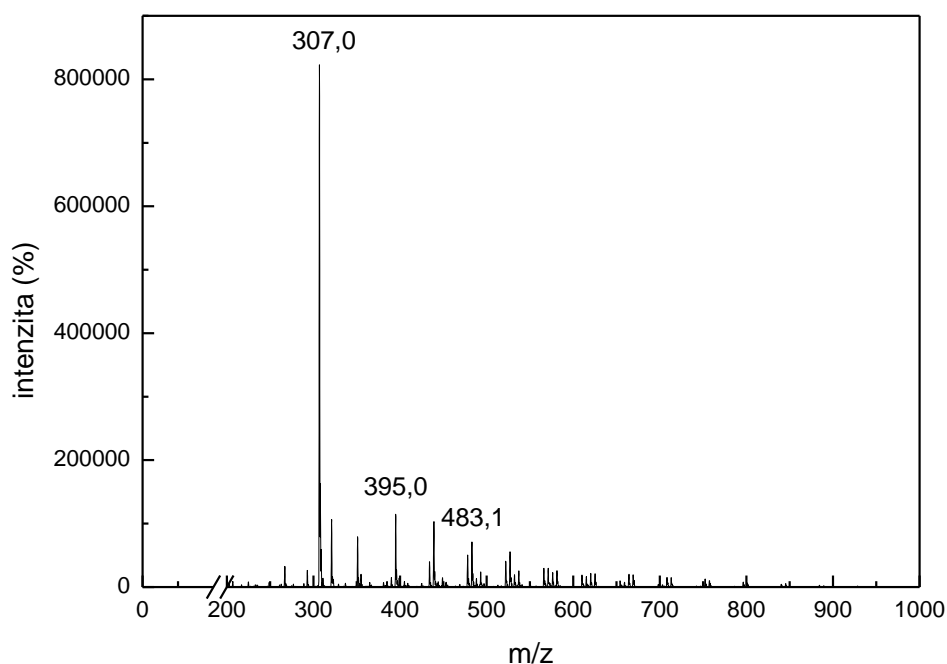
80



Obrázek 8 Výsledek měření vzorku 1 pomocí MS. Mobilní fáze 5 mM octanový pufr + 20% MeOH, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, kolona BioSep-SEC-s2000 (300 x 7,80 mm, 5 μ m).



Obrázek 9 Výsledek měření vzorku 2 pomocí MS. Mobilní fáze 5 mM octanový pufr + 20% MeOH, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, kolona BioSep-SEC-s2000 (300 x 7,80 mm, 5 μ m).



Obrázek 10 Výsledek měření vzorku 3 pomocí MS. Mobilní fáze 5 mM octanový pufr + 20% MeOH, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, kolona BioSep-SEC-s2000 (300 x 7,80 mm, 5 μ m).

Z naměřených spekter je pozorovatelná určitá shoda mezi příslušnými vzorky. Z **obrázků 8 až 10** je patrné, že pozitivní módy MS spektra vzorku 1 a vzorku 3 vykazují přítomnost přibližně stejných hmot. Z toho vyplývají dva možné závěry: vzorek 3 neobsahuje GFP-MRCK alfa či je příliš malý rozsah m/z použitého MS a ona bílkovina se nachází mimo tento rozsah. V MS spektru vzorku 2 je přítomna typická obalová křivka, což skutečně značí přítomnost proteinu. Obsah vzorku by tedy mohl odpovídat GFP. V negativním módu MS spektra nebyly přítomny m/z s vysokou intenzitou. Při dávkování mobilní fáze se ve výsledném MS záznamu objevily stejné m/z, které bylo možno pozorovat po celé délce jeho měření včetně m/z 307, která se vyskytuje i u vzorků. S největší pravděpodobností se bude jednat o nečistoty přítomné ve vzorcích.

4.3 Enzymatické štěpení bílkovin

Další část této práce spočívala v enzymatickém štěpení bílkovin v daných vzorcích pomocí trypsinu, neboť v proteomických studiích je prováděna identifikace bílkovin hmotnostní spektrometrií na základě štěpení bílkovinného řetězce enzymem s jistou specifíčností. Tímto štěpením vzniknou peptidy dané bílkoviny a pomocí vzniklých peptidů určením jejich aminokyselinové sekvence lze poté dohledat příslušnou bílkovinu v databázi.

4.3.1 Pracovní postup úpravy bílkovin

Celý pracovní postup byl aplikován na všechny tři biologické vzorky a dále na standardní bílkoviny ovalbumin a BSA. Postup úpravy bílkovin lze shrnout do několika základních kroků:

1) Srážení

Do každé mikrozkušavky bylo odebráno 900 μl příslušného vzorku, k tomu přidáno 100 μl CF_3COOH . Naplněné mikrozkušavky byly promíchány a následně inkubovány 30 minut na ledě. Po proběhlé inkubaci byly jednotlivé naplněné mikrozkušavky centrifugovány 15 minut při 10 000 ot./min. Sraženina bílkovin se objevila pouze u vzorku 2 (GFP) a vzorku 3 (GFP-MRCK alfa). Vzorek 1 (negativní kontrola) byl proto znovu centrifugován, tentokrát 10 minut při 14 500 ot./min. I přes opakovanou centrifugaci nebyla na první pohled přítomna sraženina ve vzorku 1. Následně byl odstraněn z mikrozkušavek supernatant a přítomné sraženiny byly promyty malým množstvím studeného acetonu a posléze vysušeny na vzduchu.

2) Redukce a alkylace

Po vysušení byl 1 mg vzniklé sraženiny každého vzorku rozpuštěn v 1 ml roztoku, který byl složený z 8 M močoviny a 0,4 M NH_4HCO_3 . Z každého roztoku bílkovin bylo poté odpipetováno do mikrozkušavky 113 μl a k tomu přidáno 28 μl 45 mM roztoku DTT (objemový poměr 4/1). DTT slouží k redukci disulfidických můstků mezi postranními řetězci cysteinu. Dále následovala inkubace 15 minut ve vyhřívané blokové lázni na 50°C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo následně do mikrozkušavek přidáno 28 μl 100 mM IAA (objemový poměr 4/1). Následovala inkubace 15 minut při laboratorní teplotě. IAA se používá jako alkylační činidlo, které brání zpětnému vzniku disulfidických můstků. Důvodem

provedení redukce a alkylace bývá zajištění lepšího přístupu trypsinu k samotnému řetězci bílkoviny.

3) Štěpení trypsinem

50 µg trypsinu bylo rozpuštěno v 660 µl 1 mM HCl. Do mikrozkuhavky, kde byl přítomen roztok alkylovaných bílkovin bylo dále přidáno 60 µl roztoku trypsinu a poté 220 µl destilované vody. Štěpení bílkovin pomocí trypsinu probíhalo 24 hod. při 37 °C ve vyhřívané blokové lázni. Po inkubaci byly vzorky uloženy do mrazničky a tím bylo štěpení trypsinem ukončeno [64-66].

4.3.2 Výsledky měření z MS

Měření byla realizována ve společnosti Zentiva k.s., která má k dispozici další laboratorní vybavení pro měření vzorků obsahujících bílkoviny. K proteomickým měřením se používala kolona Kinetex C18 (2,6 µm, 150 x 4,6 mm) a jako mobilní fáze směs gradientu ACN/H₂O s přídavkem 0,1% HCOOH v obou těchto složkách. Zvláštní postavení zde zaujímá hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap, který měří m/z s vysokým rozlišením a s přesností až na pět desetinných míst. Také dokáže spočítat elementární složení analyzované látky. Je složen ze dvou analyzátorů: lineární iontová past (LTQ) a Orbitrap. V tomto typu MS probíhá měření full scanových dat, neustále dochází ke snímání m/z v nastaveném rozmezí při gradientovém složení mobilní fáze 5 – 100 %. V daném čase si hmotnostní spektrometr vybere pět nejintenzivnějších iontů. Příslušné ionty podrobí fragmentaci v iontové pasti s jednoatomovými molekulami He a vznikne fragmentační spektrum každého z nich. Poté následuje proces dekonvoluce, tedy přiřazení nábojů jednotlivým m/z. Výsledkem je softwarová tabulka aminokyselinových sekvencí některých peptidů příslušné bílkoviny, která se porovnává s databází SwissProt volně přístupnou na internetové stránce www.matrixscience.com. Nastavené parametry a konkrétní typ používaného přístroje jsou uvedeny v **tabulce 12**.

Tabulka 12 Podmínky separace na koloně Kinetex C18.

Kapalinový chromatograf: kvarterní pumpa Rheos Allergo (dříve Flux Instruments, v současnosti firma Thermo Fisher Scientific, MA, USA), chlazený autosampler na 5°C HTS PAL (CTC Analytics, Švýcarsko), LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), počítačový program pro zpracování výsledků Xcalibur 2.1

Podmínky měření

Průtok mobilní fáze: 600 µl/min

Teplota kolony: 30°C

Dávkovaný objem: 20 µl

Typ skenu: Full Scan a MS/MS

Rozsah snímání hmot: 400 – 1800 m/z

Fragmentor (velikost napětí na kapiláře): 125 V

Polarita: pozitivní mód

Teplota kapiláry: 300 °C

Napětí kapiláry: 1 V

Průtok sušícího plynu: 45 psi

Napětí v iontovém zdroji: 4 kV

Mobilní fáze

Tlak na koloně (Bar)

ACN + H₂O s přidavkem 0,1% HCOOH

400

Vzhledem k nízkému objemu všech měřených vzorků, bylo nutné provést jejich ředění pomocí H₂O s přidavkem 0,1% HCOOH v poměru 1:1. Výsledný záznam MS spektra všech rozdílných biologických vzorků odhalil přítomnost stejné odezvy v 17. minutě, která zřejmě odpovídá majoritnímu intaktnímu proteinu - trypsinu. V záznamu nebyly nalezeny enzymaticky rozštěpené peptidy, ale pouze obalová křivka značící přítomnost proteinu, pro nás neidentifikovatelného. Použitá databáze odhalila, a tím pádem potvrdila převažující zastoupení enzymu trypsinu v biologických vzorcích, viz **obrázek 11**, a enzym tak odpovídá získané odezvě. Celkový výsledný záznam zahrnuje i další údaje včetně proteinové sekvence

a nalezených AMK, a na základě kterých databáze určí přítomnost bílkoviny v daném analyzovaném vzorku.

MASCOT Search Results

Protein View: TRYP_PIG

Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1

Database: SwissProt

Score: 126

Nominal mass (M_r): 24394

Calculated pI: 7.00

Taxonomy: [Sus scrofa](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of TRYP_PIG against nr](#).

Search parameters

MS data file: GFP_run01.mgf

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Protein sequence coverage: 17%

Matched peptides shown in **bold red**.

```
1  FPTDDDDKIV GGYTCAANSI PYQVSLNSGS HFCGGLINS QWVVSAAHCY
51  KSRIQVRLGE HNIDVLEGNE QFINAAKIIT HPNFNGNTLD NDIMLIKLS
101 PATLNSRVAT VSLPRSCAAA GTECLISGWG NTKSSGSSYP SLLQCLKAPV
151 LSDSSCKSSY PGQITGNMIC VGFLEGGKDS CQGDSSGGPVV CNGQLQGIVS
201 WGYGCAQKNK PGVYTKVCNY VNWIIQQTIAA N
```

Unformatted sequence string: [231 residues](#) (for pasting into other applications).

Obrázek 11 Výsledek z internetové databáze potvrzující přítomnost trypsinu v biologickém vzorku obsahující GFP [67].

V záznamech MS spektra standardních bílkovin ovalbuminu a BSA bylo možné pozorovat jednotlivé peptidy a databáze na základě proběhlé fragmentace potvrdila jejich skutečnou přítomnost ve vzorku. Výsledky potvrzení bílkovin ovalbuminu a BSA ve vzorcích představují **obrázky 12 a 13**.

Protein View: OVAL_CHICK

Ovalbumin OS=Gallus gallus GN=SERPINB14 PE=1 SV=2

Database: SwissProt
 Score: 407
 Nominal mass (M_r): 42854
 Calculated pI: 5.19
 Taxonomy: [Gallus gallus](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of OVAL_CHICK against nr](#).

Search parameters

MS data file: Chicken_ovalbumin_run02-acid.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Protein sequence coverage: 41%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MGSIGAASME FCFDVFKELK VHHANENIFY CPIATMSALA MVYLGAKDST
51  RTQINKVVRF DKLPFGGDSI EAQCGTSVNV HSSLRDILNQ ITPNDVYSE
101 SLASRLYAE RYPILPEYLQ CVKELYRGGL EPINFQTAAD QARELINSWV
151 ESQTNGIIRN VLQPSSVDSQ TAMVLVNAIV FKGLWEKAFK DEDTQAMPFR
201 VTEQESKPVQ MMYQIGLFRV ASMASEKMKI LELPFASGTM SMLVLLPDEV
251 SGLEQLESII NFEKLTEWTS SNVMEERKIK VYLPRMKMEE KYNLTSVLMA
301 MGITDVFSSS ANLSGISSAE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGSAAEAGV
351 DAASVSEEFR ADHPFLFCIK HIATNAVLFF GRCVSP
  
```

Unformatted sequence string: [386 residues](#) (for pasting into other applications).

Obrázek 12 Výsledek z internetové databáze potvrzující přítomnost ovalbuminu [67].

Protein View: ALBU_BOVIN

Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4

Database: SwissProt
 Score: 159
 Nominal mass (M_r): 69248
 Calculated pI: 5.82
 Taxonomy: [Bos taurus](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of ALBU_BOVIN against nr](#).

Search parameters

MS data file: BSA_run02-acid.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Protein sequence coverage: 33%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MKWVTFISLL LLFSSAYSRC VFRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
51 FSQYLQQCPE DEHVKLVEL TEFATCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCCCKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPLK PDPNTLCDEF
151 KADEKKFWGK YLYEIAARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFQE CCQAEDRGAC
201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFPKAE
251 FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301 CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFREDKDVCK NYQEAKDAFL
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCAKDDPH ACYSTVEDKL
401 KHLVDEPQNL IKQNCQDFEK LGEYGEQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
451 RSLCKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTGCC
501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENEVAFVDK CCARDDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTALA
  
```

Unformatted sequence string: [607 residues](#) (for pasting into other applications).

Obrázek 13 Výsledek z internetové databáze potvrzující přítomnost BSA [67].

Proč se nepodařilo rozštěpit příslušné biologické vzorky pomocí trypsinu, zůstává záhadou, nicméně existují jisté předpoklady. Jeden z nich je takový, že přítomnost inhibitorů proteáz může do jisté míry ovlivnit štěpení bílkovin trypsinem. Inhibitory proteáz se podílejí na přípravě vzorků. I koncentrace bílkovin GFP a GFP-MRCK alfa ve vzorcích může hrát jistou roli. Vzhledem k jejich nízké koncentraci nedošlo k vysrážení těchto bílkovin, ale mohlo dojít k vysrážení pouze těch, které se za běžných okolností vyskytují v HeLa buňce. Je možné, že

bílkoviny GFP a GFP-MRCK alfa se nacházejí ve vzorcích s pozitivní fluorescenční aktivitou dokonce pod limitem detekce této citlivé metody založené na MS.

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce neprokazuje jednoznačně, že fluorescenční odezva biologických vzorků s GFP a GFP-MRCK alfa pochází právě od přítomnosti těchto bílkovin ve vzorcích, neboť v nich nebyly jednoznačně prokázány jinými, zde použitými metodami. Ačkoliv nebyly získány jednotlivé frakce obsahující GFP a kinázu MRCK alfa z proteinového lyzátu, přesto přinesla prováděná charakterizace příslušných tří vzorků pomocí nejrozličnějších metod řadu zajímavých poznatků.

Práce byla směřována na základě použití nejjednodušších postupů až po metody náročnější a snahou bylo získat co nejvíce poznatků o každém vzorku z jejich jednotlivých měření. Celý pracovní postup byl založen na testování nejrozličnějších typů separačních kolon, včetně takových, které jsou přímo doporučeny pro separaci proteinů. Zároveň s tímto testováním byla také vyzkoušena řada mobilních fází. Použitá rozpouštědla jako mobilní fáze nepotlačovala fluorescenci proteinů ve vzorcích natolik, aby je nebylo možné detekovat. Měření byla realizována na třech HPLC zařízeních a snímání bylo prováděno pomocí UV/VIS detekce, fluorescenční detekce a MS. I přes tuto širokou škálu dostupných prostředků nebylo dosaženo rozdílných výsledků mezi jednotlivými vzorky.

Na základě dosažených výsledků lze tedy předpokládat několik závěrů o povaze příslušných biologických vzorků. Jeden z nich je takový, že výsledky, které jsou pozorovatelné na získaných chromatogramech vzorků mohou odpovídat pouze proteinům, které jsou v HeLa buňce za normálních okolností přítomny. Dále se může jednat o buněčné lyzáty, které neobsahují hledané proteiny GFP a GFP-MRCK alfa. Příslušné biologické vzorky jsou variabilním materiálem a bylo prokázáno, že jejich přirozená fluorescence po určité době klesá. Je tedy vysoce pravděpodobné, že složení každého vzorku se vlivem časté změny způsobené manipulací se vzorky či stáním za laboratorní teploty mění. Z tohoto důvodu ovlivňuje stáří příslušných vzorků závěrečné výsledky každého měření. Vzhledem k těmto uvedeným faktorům se jejich identifikace stává velmi náročnou a z hlediska techniky HPLC prakticky nemožnou. Přítomnost GFP a GFP-MRCK alfa může být v těchto biologických vzorcích pod hranicí detekce použitých metod HPLC-UV, HPLC-FD a HPLC-MS.

6 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z., Základní analytická chemie, nakladatelství Karolinum, Praha 2007.
- [2] Štulík K. a kolektiv, Analytické separační metody, nakladatelství Karolinum, Praha 2004.
- [3] Modern Analytical Chemistry HPLC.pdf
- [4] Švec F., Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií?, Chemické listy 103 (2009), 266-270.
- [5] Sobotníková J., Bosáková Z., Čabala R., Coufal P., Pacáková V., Štulík K., Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Chemické listy 104 (2010), 1226-1231.
- [6] Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M., Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, Chemické listy 101 (2007), 190-199.
- [7] <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc5.pdf> [20.4. 2013, 11:23].
- [8] Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L., Practical HPLC method development, Canada 1997.
- [9] Volný M., Hmotnostní spektrometrie: Přehled zajímavých oblastí aktuálního vývoje, Chemické listy 105 (2011), 230-236.
- [10] Holčápek M., Jandera P., Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS), Chemické listy 92 (1998), 278-286.
- [11] Mann M., Hendrickson R. C., Pandey A., Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry, Annu. Rev. Biochem. 70 (2001), 437-473.
- [12] Wysocki V. H., Resing K. A., Zhang Q., Cheng G., Mass spectrometry of peptides and proteins, Science Direct, Methods 35 (2005), 211-222.
- [13] Trauger S. A., Webb W., Siuzdak G., Peptide and protein analysis with mass spectrometry, Spectroscopy 16 (2002), 15-28.

- [14] http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS067_Spojeni_separacni_MS.pdf
[20.4. 2013, 12:01].
- [15] Voet D., Voet J. G., Biochemistry. Praha, Victoria Publishing, 1995.
- [16] Galvasová A.: Týmový projekt: Významné biochemické látky a laboratorní techniky jejich stanovení v biomedicínských oborech II., ČVÚT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky, Praha 2012.
- [17] Kovářová H., Proteomika v postgenomové době, Chemické listy 99 (2005), 886-889.
- [18] Chmelík J., Proteomický průvodce, Chemické listy 99 (2005), 883-885.
- [19] Liebler D. C., Introduction to Proteomics – Tools for the New Biology, Humana Press Inc. 2002.
- [20] <http://web.vscht.cz/koplikr/Peptidy%20a%20bílkoviny.pdf> [21.4. 2013, 09:13].
- [21] <http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/separace.pdf> [21.4. 2013, 09:24].
- [22] http://webcast.skola-profession.cz/Contexts/profession/Documents/SMB_Overeni_cistoty.pdf
[21.4. 2013, 09:40].
- [23] http://www.waters.com/waters/en_US/GPC---Gel-Permeation-Chromatography/nav.htm?locale=en_US&cid=10167568 [21.4. 2013,10:00].
- [24] <http://www.blogsua.com/pdf/hplc-of-peptides-and-proteins-methods-and-protocols.pdf> [21.4. 2013, 10:00].
- [25] http://www.pmfhk.cz/Prednasky/separacni_metody.pdf [21.4. 2013, 10:01].
- [26] Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L., Practical HPLC method development, Canada 1997.
- [27] Vaňková H., Peptidové mapy, Chemické listy 93 (1999), 120-127.
- [28] www.hplc.cz/detektory [21.4. 2013, 15:43].
- [29] <http://www.smithsonianmag.com/science-nature/Henrietta-Lacks-Immortal-Cells.html> [21.4. 2013, 17:32].
- [30] <http://www.jhu.edu/jhumag/0400web/01.html> [21.4. 2013, 17:33].

- [31] Kremers G.-J., Gilbert S. G., Cranfill P. J., Davidson M. W., Piston D. W., Fluorescent proteins at a glance, *Journal of Cell Science* 124 (2011), 157-160.
- [32] Zimmer M., Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior, *Chem. Rev.* 102 (2002), 759-781.
- [33] <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>
[21.4. 2013, 17:36].
- [34] http://www.rcsb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/download/GFP.pdf [21.4. 2013, 17:37].
- [35] Ormö M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y., Remington S. J., Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein, *Science* 273 (1996), 1392-1395.
- [36] <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html>
[21.4. 2013, 17:40].
- [37] Cotteret S., Chernoff J., The evolutionary history of effectors downstream of Cdc42 and Rac, *Genome Biology* 2002, 3 (2):reviews0002.I-0002.8.
- [38] Leung T. et al., Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization, *Molecular and Cellular Biology* 18 (1998), 130-140.
- [39] Nakamura N. et al., Phosphorylation of ERM proteins at filopodia induced by Cdc42, *Genes to Cells* 5 (2000), 571-581.
- [40] Wilkinson S. et al., Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion, *Nature Cell Biology* 7 (2005), 255-261.
- [41] Tan I. et al., A tripartite complex containing MRCK modulates lamellar actomyosin retrograde flow, *Cell* 135 (2008), 123-126.
- [42] Chen X. Q. et al., The myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase is involved in the regulation of neurite outgrowth in PC12 cells, *J Biol Chem.* 274 (1999), 19901-19905.

- [43] Gally Ch., Wissler F., Zahreddine H., Quintin S., Landmann F., Labouesse M., Myosin II regulation during *C. elegans* embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles, *Development* 136 (2009), 3109-3119.
- [44] Cmejla R. et al., A novel iron responsive element in the 3'UTR of human MRCK alpha, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341 (2006), 158-166.
- [45] Rouault TA., The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease, *Nat Chem Biol.* 2 (2006), 406-414.
- [46] Piccinelli P., Samuelsson T., Evolution of the iron-responsive element, *RNA* 13 (2007), 952-966.
- [47] Tomoyuki S. et al., Activation of LIM Kinases by Myotonic Dystrophy Kinase-related Cdc42-binding Kinase α , *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), 23092-23096.
- [48] Ivan T. et al., Phosphorylation of a Novel Myosin Binding Subunit of Protein Phosphatase 1 Reveals a Conserved Mechanism in the Regulation of Actin Cytoskeleton, *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), 21209-21216.
- [49] Ivan T. et al., Intermolecular and Intramolecular Interactions Regulate Catalytic Activity of Myotonic Dystrophy Kinase-Related Cdc42-Binding Kinase α , *Molecular and Cellular Biology* 21 (2001), 2767-2778.
- [50] www.pubmed.com [21.4. 2013, 17:55].
- [51] Yanming Z. Et al., Cloning and Chromosomal Location of a Novel Member of the Myotonic Dystrophy Family of Protein Kinases, *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), 10013-10020.
- [52] Raven P. H., Johnson G. B., *Biology*, nakladatelství McGraw-Hill, 1999.
- [53] Vondrejs V., Storchová Z., *Genové inženýrství I.*, nakladatelství Karolinum, Praha 1997.
- [54] Vondrejs V., *Genové inženýrství II.*, nakladatelství Karolinum, Praha 2001.
- [55] Vondrejs V., *Genové inženýrství III.*, nakladatelství Karolinum, Praha 2003.

- [56] Lodish, Berk, Kaiser, Krieger, Scott, Bretscher, Ploegh, Matsudaira, Molecular Cell Biology, nakladatelsví Freeman and Company, 2008.
- [57] http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10-0826_transfection_tutorial_interactive.pdf [21.4. 2013, 18:05].
- [58] Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžicková V., Koptíková J., Metody molekulární biologie, Brno 2005.
- [59] http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_22/S1462399403006562sup001.pdf [21.4. 2013, 18:13].
- [60] Gehl J., Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research, Acta Physiol Scand 177 (2003), 437-447.
- [61] <http://www.labicom.cz/supelco-182/> [21.4. 2013, 22:03].
- [62] http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Yarra?utm_source=hplc&utm_medium=sechplctechniquepage&utm_campaign=2013%2BTechnique%2BPages [21.4. 2013, 22:06].
- [63] <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/BioSep-SEC-S> [21.4. 2013, 22:11].
- [64] Srbek J., Eickhoff J., Effelsberg U., Kraiczek K., Goor T., Coufal P., Chip-based nano-LC-MS/MS identification of proteins in complex biological samples using a novel polymer microfluidic device, J. Sep. Sci. 30 (2007), 2046-2052.
- [65] Franc M., Křížek T., Coufal P., Štulík K., Differentiation among various kinds of cheese by identification of casein using HPLC-chip/MS/MS, J. Sep. Sci. 33 (2010), 2515-2519.
- [66] Franc M.: Bakalářská práce: Izolace a předúprava bílkovin pro jejich identifikaci, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Praha 2007.
- [67] www.matrixscience.com [4.5. 2013, 21:19].